

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY



**POROVNÁNÍ INTERAKCÍ EKVOLU A DESMETHYLANGOLENSINU SE ŽELEZEM
A MĚDÍ**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.

Vedoucí katedry: doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

CHARLES UNIVERSITY
FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ
DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL BOTANY



**COMPARISON OF INTERACTIONS OF EQUOL AND DESMETHYLANGOLENSIN
WITH IRON AND COPPER**

DIPLOMA THESIS

Supervisor: PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.

Head of Department: doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, September 2018

Hana Němcová

PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

Dne _____

Hana Němcová

PODĚKOVÁNÍ

V první řadě bych chtěla poděkovat své školitelce paní PharmDr. Janě Karlíčkové, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce, pomoc při experimentálních měřeních, poskytnuté materiály, cenné rady při zpracování diplomové práce a především za trpělivost, kterou mi věnovala.

Dále bych chtěla poděkovat celé Katedře farmaceutické botaniky za poskytnutí laboratoře k naměření výsledků, ochotu a vstřícné jednání. Vznik této diplomové práce byl podpořen grantem GAUK 108021 C.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat také své rodině za neúnavnou podporu během celého studia.

Obsah

SEZNAM ZKRATEK	8
1 ÚVOD	9
2 CÍL	10
3 TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1 ŽELEZO	11
3.1.1 Železo mimo lidský organismus	11
3.1.2 Železo v lidském organismu	11
3.1.3 Farmakokinetika železa	13
3.1.4 Homeostáza železa	14
3.1.5 Nadbytek železa v organismu	15
3.1.6 Nedostatek železa v organismu	16
3.2 MĚĎ	17
3.2.1 Měď mimo lidský organismus	17
3.2.2 Měď v lidském organismu	17
3.2.3 Farmakokinetika mědi	19
3.2.4 Homeostáza mědi	20
3.2.5 Nadbytek mědi v organismu	21
3.2.6 Nedostatek mědi v organismu	22
3.3 ISOFLAVONOIDY	23
3.3.1 Chemická struktura	23
3.3.2 Zástupci a výskyt	24
3.3.3 Vlastnosti a využití	24
3.3.4 Metabolismus	25
3.3.5 Testované látky	27
3.4 CHELATACE	28
3.5 REDUKCE	28
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29

4.1	MATERIÁL	29
4.2	VYUŽÍVANÉ PŘÍSTROJE	29
4.3	POUŽÍVANÉ CHEMIKÁLIE.....	29
4.3.1	Chemikálie pro měření s ionty železa.....	29
4.3.2	Chemikálie pro měření s ionty mědi	30
4.4	TESTOVANÉ LÁTKY	30
4.5	VYUŽÍVANÉ PROGRAMY.....	31
4.6	METODIKA PRO MĚŘENÍ S IONTY ŽELEZA.....	31
4.6.1	Příprava základních a pracovních roztoků a vzorků testovaných látek.....	31
4.6.2	Kontrolní zkouška roztoků iontů železa.....	32
4.6.3	Kalibrace železnatých iontů.....	33
4.6.4	Chelatace železnatých iontů	34
4.6.5	Chelatace železitých iontů	35
4.6.6	Redukce železitých iontů	36
4.7	METODIKA PRO MĚŘENÍ S IONTY MĚDI.....	37
4.7.1	Příprava základních a pracovních roztoků a vzorků testovaných látek.....	37
4.7.2	Kontrolní zkouška roztoků iontů mědi	38
4.7.3	Kalibrace měďnatých iontů	39
4.7.4	Chelatace iontů mědi hematoxylinem	40
4.7.5	Chelatace měďných iontů	41
4.7.6	Chelatace měďnatých iontů	42
4.7.7	Redukce měďnatých iontů	43
5	VÝSLEDKY	44
5.1	SESTROJENÍ KALIBRAČNÍ KŘIVKY ŽELEZNATÝCH IONTŮ.....	44
5.2	INTERAKCE TESTOVANÝCH LÁTEK S IONTY ŽELEZA	45
5.2.1	Chelatační účinnost testovaných látek.....	45
5.2.2	Redukční účinnost testovaných látek	46
5.3	SESTROJENÍ KALIBRAČNÍ KŘIVKY MĚĎNATÝCH IONTŮ	48
5.4	INTERAKCE TESTOVANÝCH LÁTEK S IONTY MĚDI	49

5.4.1	Chelatační účinnost testovaných látek - metoda s hematoxylinem	50
5.4.2	Chelatační účinnost testovaných látek - metoda s bathocuproinem	51
5.4.3	Redukční účinnost testovaných látek	52
6	DISKUZE A ZÁVĚR.....	54
7	LITERATURA	57
	ABSTRAKT	61
	ABSTRACT.....	62

SEZNAM ZKRATEK

A	Absorbance
AD	Alzheimerova choroba (z angl. Alzheimer's disease)
ATOX1	Antioxidační chaperon mědi (z angl. Antioxidant 1 Copper Chaperone)
ATP	Adenosintrifosfát
ATPasa	Adenosintrifosfatasa
ATP7A	Měď transportující ATPasa 1 (z angl. Copper Transporting ATPase 1)
ATP7B	Měď transportující ATPasa 2 (z angl. Copper Transporting ATPase 2)
BCS	Disodná sůl bathocuproindisulfonové kyseliny
CCO	Cytochrom c oxidasa
CCS	Chaperon mědi pro superoxiddismutasu (z angl. Copper Chaperone for Superoxid dismutase)
COX17	Chaperon mědi pro cytochrom c oxidasu (z angl. Cytochrome C Oxidase Copper Chaperone)
CP	Ceruloplasmin
CTR1	Selektivní transportér pro měď 1 (z angl. Copper Transporter 1)
DMA	<i>O</i> -desmethylangolensin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (z angl. Deoxyribonucleic Acid)
HA	Hydroxylamin hydrochlorid
HEM	Hematoxylin
LDL	Lipoproteiny o nízké hustotě (z angl. Low Density Lipoprotein)
MT	Metalothioneiny
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
SOD	Superoxiddismutasa
Trientin	Triethylentetraamin

1 ÚVOD

Železo i měď patří mezi esenciální stopové prvky nezbytné pro všechny živé organismy. Jsou přijímány potravou, ale jejich denní příjem je poměrně malý. Přesto hrají důležitou roli pro fungování celého organismu.

Železo je odpovědné za transport kyslíku. Je součástí mnoha enzymů a podílí se například na buněčném dýchání, tvorbě energie či syntéze DNA.

Měď je důležitým kofaktorem pro řadu enzymů, které zajišťují antioxidační aktivitu, tvorbu energie, homeostázu železa, vývoj pigmentu atp.

Zásadní vlastností obou kovů je schopnost existovat v různých redoxních stavech a mezi těmito stavy přecházet za současného přijetí nebo uvolnění elektronu. Tento elektron může mít fatální účinky na organismus, protože díky němu se mohou uvolňovat volné radikály, které poškozují bílkoviny, lipidy i DNA. Pokud je však v těle udržována správná hladina iontů obou kovů, převažuje jejich kladný vliv na organismus.

Isoflavonoidy jsou významnou skupinou přírodních látek, které se hojně využívají pro své estrogení, antianginózní, antiaterosklerotické, antiagregační, protirakovinné, antioxidační účinky aj. Antioxidační aktivita je přirozeně propojena se schopností látek chelatovat volné ionty kovů, které by jinak mohly potencovat vznik volných radikálů. Na druhou stranu tyto látky vykazují i negativní prooxidační aktivitu, která je připisována jejich schopnosti redukovat přítomné ionty kovů, čímž podporují vznik volných radikálů.

2 CÍL

Cílem této diplomové práce bylo změřit a porovnat interakce dvou metabolitů isoflavonoidů ekvolu a desmethylangolensinu se železem a mědí při různých (pato)fyzilogicky významných pH a odvodit vztah mezi strukturou testovaných látek a jejich schopností chelatovat nebo redukovat ionty příslušných kovů.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 ŽELEZO

Železo (Fe) je jedním ze stopových prvků (dále se k nim řadí např.: zinek, měď, jod, mangan, chrom, fluor atd.), které jsou nezbytné pro všechny živé organismy. Jak již název napovídá, stopové prvky se v organismu vyskytují v mizivých množstvích, nicméně jsou životně důležité pro správnou činnost organismu jako celku.¹

3.1.1 Železo mimo lidský organismus

Železo bylo známo už v době 4000-3000 let před n. l. například v Egyptě. Do střední Evropy se dostalo kolem osmého století před n. l. Postupně začalo nahrazovat doposud používaný bronz a svého vrcholu dosáhlo v době železné.² Používaly se nejrůznější slitiny železa především na výrobu nástrojů a zbraní. Jednotlivé slitiny se od sebe liší fyzikálními, mechanickými a technologickými vlastnostmi.³

3.1.2 Železo v lidském organismu

V lidském těle je přítomno 3-5 g železa.⁴ Toto množství se liší dle pohlaví. Více železa je obsaženo v těle mužů, u žen je ho přirozeně o něco méně, což je zapříčiněno především ztrátami při menzes.⁵

Železo se dělí na tři základní formy a to na železo funkční, zásobní a transportní. Nejvíce je v organismu zastoupeno železo funkční. 60-70 % železa je vázáno na hemoglobin v erytrocytech, dále pak na myoglobin ve svazech (10 %).^{5, 6} Železo je také spjata s funkcí řady enzymů, v nichž je vázáno přibližně 0,1 % z celkového množství železa.⁷

Zásobní železo je v organismu zastoupeno z 20-30 %.⁶ Největší zásobárnou tohoto mikroprvku jsou játra, dále pak slezina, střevní sliznice a kostní dřeň.⁸ Ve všech těchto tkáních je železo vázáno především na bílkovinu ferritin. V makrofázích jater a kostní dřeni je železo vázáno na hemosiderin. Toto železo je ale hůře mobilizovatelné než z ferritinu.⁵

A nakonec transportní železo, to je vázáno na bílkovinu krevní plasmy transferin a v organismu zastupuje 0,1-0,2 % celkového železa.⁷

3.1.2.1 Fyziologické funkce železa

Železo má v organismu nenahraditelnou funkci. Především zajišťuje transport a skladování kyslíku, je důležité pro buněčné dýchání, tvorbu energie, syntézu DNA, neurotransmiterů a kolagenu, hraje také roli v metabolismu mastných kyselin, peroxidu vodíku aj.⁶

Nejdůležitější vlastností železa je schopnost existovat ve dvou redoxních stavech, ve formě redukovaných železnatých (Fe^{2+}) iontů a oxidovaných železitých (Fe^{3+}) iontů. Dokáže tedy darovat nebo přijímat elektrony. Tato vlastnost může být za určitých podmínek nebezpečná, protože kvůli ní mohou vznikat volné radikály.⁹ Takovéto železo lze souhrnně pojmenovat jako železo nehemové. V nehemových sloučeninách je železo vázáno přes vazbu na síru. V organismu se však ve větším množství nachází železo hemové, které slouží jako ligand čtyř pyrrolových jader, a tvoří základ pro strukturu hemu. Jak hemové, tak i nehemové železo, je v organismu vázáno na různé proteiny, které mají rozličnou funkci.^{6,8}

3.1.2.2 Proteiny vázající železo

Na tomto místě uvádím některé enzymy, které vážou hemové a nehemové železo:

a) HEMOVÉ železo:

1) Hemoglobin - vazba a transport kyslíku

Skládá se ze čtyř podjednotek. Každá podjednotka obsahuje nebílkovinnou (hem) a bílkovinnou (globin) část. Jedna molekula hemoglobinu dokáže navázat a přenášet čtyři molekuly kyslíku.

2) Myoglobin - vazba kyslíku ve svalech

Skládá se jen z jedné podjednotky, která obsahuje jeden hem, a proto váže jen jednu molekulu kyslíku.

3) Cytochromy a, b, c - transport elektronů při buněčném dýchání

4) Cytochrom c oxidasa - energetický metabolismus

5) Katalasa a peroxidasy - rozklad peroxidu vodíku (H_2O_2)

b) NEHEMOVÉ železo:

1) NADH dehydrogenasa - oxidativní metabolismus

2) Ribonukleotid reduktasa - syntéza DNA

3) Aldehyd oxidasa - oxidace aldehydů na karboxylové kyseliny^{6,8}

3.1.3 Farmakokinetika železa

3.1.3.1 Příjem

Denní příjem se opět liší dle pohlaví. Vzhledem k tomu, že v ženském těle je přirozeně méně železa, je nutné ho přijímat ve větším množství. Doporučená denní dávka je tedy pro ženy 10-20 mg a pro muže 5-10 mg.⁵ Pro těhotné tato dávka činí 27 mg.¹⁰

Zdroje železa lze opět rozdělit podle toho, jestli nesou železo hemové nebo nehemové. Hemové železo nalezneme v živočišných zdrojích. Nejbohatší na takové železo jsou hovězí a telecí játra a dále pak červené maso všeobecně. Zdroje rostlinného původu obsahují pouze nehemové železo. Platí, že téměř všechny potraviny obsahují určité množství železa.¹¹ Různé druhy ovoce (čerstvé i sušené), ořechy a semena, rozinky, zelenina (špenát) či pšeničné klíčky obsahují značné množství tohoto kovu.⁴

3.1.3.2 Absorpce

V průměrné denní stravě nalezneme 10-50 mg železa, z tohoto množství se vstřebá jen 10-15 %, při nedostatku železa v organismu až 25 %.^{5,7}

Biologická dostupnost opět závisí na tom, zdali se jedná o železo hemové nebo nehemové. Obecně platí, že hemové železo se vstřebává lépe a více (15-35 %) než železo nehemové (2-20 %).^{6,7} Samotný proces vstřebávání je lépe popsán u nehemového železa.⁹ Z tohoto důvodu je v textu níže popsána jeho farmakokinetika.

Hlavním místem absorpce je duodenum a horní část jejunu.⁷ V žaludku vlivem nízkého pH a přítomnosti pepsinu dochází k uvolnění iontů železa z komplexů. Vzhledem k tomu, že v potravě je železo přítomno nejčastěji ve formě železitých iontů, je nejprve nutno převést tyto ionty na ionty železnaté. Tuto redukční schopnost má například kyselina askorbová a některé aminokyseliny (cystein, histidin). Nejdůležitější je ale duodenální cytochrom b reduktasa (Dcytb). Jedná se o ferrireduktasu, která se nachází na apikální membráně enterocytů a jejíž funkce je závislá na kyselině askorbové.¹²

Redukované železo pronikne do enterocytu přes speciální přenašeč - transportér dvojmocného železa 1 (DMT-1).¹² Funguje na principu Fe^{2+} - H^{+} symportu. Nízké pH zvyšuje protonový gradient, který žene železnaté ionty do buňky.⁵ Tento transportér nepřenáší pouze železnaté ionty, ale i další dvoumocné ionty jiných kovů jako je Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} a Pb^{2+} .⁹ Mezi těmito ionty dochází navzájem ke kompetici.¹²

V enterocytech se následně cesta železa rozděluje. Buď je železo začleněno do ferritinu, nebo odchází do cirkulace.⁶

3.1.3.3 Faktory ovlivňující absorpci

Rozlišujeme dva typy faktorů:

- a) podporující absorpci, kam se dá zahrnout žaludeční acidita, kyselina askorbová, kyselina citronová a kyselina mléčná;
- b) zpomalující absorpci. Různé látky mohou vytvářet se železem špatně vstřebatelné komplexy. Patří mezi ně například kyselina fytová, kterou nalezneme v celozrnných potravinách, otrubách či sóje, dále kyselina šťavelová ze špenátu, rebarbory, čokolády, a v neposlední řadě také polyfenoly v kávě nebo čaji.⁸

3.1.3.4 Distribuce a metabolismus

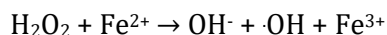
Do systémového řečiště přechází přes membránový protein ferroportin. Železo je oxidováno na železité ionty ferroxidasou hefestinem, který se nejvíce vyskytuje ve střevě, játrech a makrofázích. V tenkém střevě dále působí oxidasa ceruloplasmin. Železo v podobě Fe^{3+} iontů se nyní váže na transferin. To je nejdůležitější přenašeč iontů železa v krvi. Nejvíce železa je transportováno jednak do buněk kostní dřeně, kde probíhá syntéza červených krvinek, jednak do jater, kde je železo skladováno ve vazbě na ferritin.^{6, 10} Do buněk přechází opět ve stavu redukovaném (Fe^{2+}).⁸

3.1.3.5 Exkrece

Železo opouští organismus různými cestami. Nejvíce ho odchází krví při menzes. Dále pak olupováním buněk trávicího traktu, žlučí, močí či kůží. Neexistuje ale žádný přesný mechanismus exkrece.^{8, 9} Denně se z organismu vyloučí 1-2 mg železa.¹³

3.1.4 Homeostáza železa

Doposud byl zmíněn především pozitivní vliv iontů železa na organismus. Vzhledem k tomu, že železo dokáže přecházet mezi jednotlivými redoxními stavy, může usnadnit tvorbu nebezpečných volných radikálů, které pak mohou poškodit bílkoviny, DNA a lipidy.¹³ Nejčastěji popisovanou reakcí, při které dochází k produkci volného hydroxylového radikálu z peroxidu vodíku, je Fentonova reakce (Obrázek č. 1), která platí i pro ionty mědi.⁶



Obrázek č. 1: Fentonova reakce

Je proto nesmírně důležité, aby množství železa v organismu bylo kontrolováno.

Jak již bylo uvedeno dříve, denní úbytek železa činí 1-2 mg. Toto množství přijímá tělo zpět do organismu z potravy. Avšak jen na syntézu hemoglobinu je denně potřeba okolo 20-25 mg železa. Z toho vyplývá, že železo musí být v organismu pečlivě skladováno a s rozvahou využíváno. Nejdůležitější roli v tomto řízení zastupuje hormon hepcidin, který je produkován především játry.¹³ Hlavními oblastmi k řízení homeostázy Fe v organismu jsou absorpce železa ve střevě, recyklace železa a doplňování železa do zásobních forem.⁵

Ani nadbytek, ani nedostatek železa tělu neprospívá.¹³

3.1.5 Nadbytek železa v organismu

Při nadměrném množství železa v těle dochází k jeho ukládání v játrech, srdci, slinivce a endokrinních žlázách. Ve zvýšeném množství se pak uvolňují volné radikály. Zvyšuje se riziko vzniku jaterní cirhózy, rakoviny, artritidy, arytmie, srdečního selhání, poškození sítnice, diabetu mellitu či neurodegenerativních onemocnění. Ve finále dochází k poruše funkce životně důležitých orgánů a tento stav končí smrtí. Možnostmi léčby je flebotomie nebo chelatační terapie.¹³

3.1.5.1 Hemochromatózy

Toto onemocnění souvisí s nahromaděním železa v buňkách různých orgánů. Množství železa v těle se může zvednout až na 50 g. Rozlišují se dva typy - primární a sekundární.⁵

Primární hemochromatóza je autozomálně recesivní dědičná choroba. Ve většině případů je příčinou mutace genu, která brání přirozené syntéze hepcidinu. Nedostatek hepcidinu tělo vnímá jako nedostatek železa, proto dochází ke zvýšené absorpci železa z potravy.⁵

Příčinou sekundárních hemochromatóz je porucha metabolismu železa při různých jiných onemocněních, například jater. Dochází k nim také při častých krevních transfúzích.⁵

3.1.5.2 Aceruloplasminémie

Podkladem tohoto onemocnění je mutace genu pro ceruloplasmin, který fyziologicky působí jako ferroxidasa. Dochází k nadměrnému nahromadění železa v mozku, játrech a pankreatu.¹³

3.1.5.3 Hypotransferrinémie

Při tomto onemocnění dochází k tomu, že se železo v plasmě nemůže vázat na transferin, protože ten je zde ve sníženém množství. Volné železo se pak opět ukládá především do jater.¹³

3.1.6 Nedostatek železa v organismu

Železo je v organismu nejvíce využíváno k syntéze hemoglobinu. Jeho nedostatek tak porušuje přirozenou syntézu červených krvinek a v organismu převládne anémie.¹³

3.1.6.1 Anémie z nedostatku železa

Toto onemocnění patří mezi nejčastější onemocnění způsobené nedostatkem stopového prvku.¹⁴ Základem je snížený příjem, špatné vstřebávání či zvýšená potřeba železa.¹³ Mezi osoby se zvýšenou potřebou železa patří především děti, těhotné a kojící ženy a lidé vyššího věku.⁸

K nedostatku železa může dojít ztrátami krve při gastrointestinálním krvácení, darování krve, rakovině jícnu, žaludku, tlustého střeva.¹³

Hlavními příznaky nedostatku železa jsou bledá a nezdravá pokožka, rychlá únava, bolesti hlavy, stavy slabosti a mdlob, vypadávání vlasů, gastrointestinální obtíže (zácpa, nadýmání, meteorismus), bolavé koutky.⁴

3.2 MĚĎ

Měď, stejně jako železo, patří mezi esenciální mikrobiogenní prvky, které jsou nezbytné pro funkci všech živých organismů.¹

3.2.1 Měď mimo lidský organismus

3.2.1.1 Význam mědi pro lidstvo

Literatura uvádí, že měď byla objevena velmi brzy. Již v 6. tisíciletí před n. l. byla lidstvu známa. Dobrymi předpoklady pro tak brzké objevení byla jednak hojnost jejího výskytu, ale i její charakteristicky výrazná červená barva.¹⁵

Její jméno cuprum (Cu) vzniklo od slova Cyprus (Kypr), kde se shodou okolností nacházelo také jedno z jejích nejvýznamnějších nalezišť.¹⁵

Je považována za jeden z nejdůležitějších kovů v lidských dějinách. Nejprve se využívala samotná měděná ruda. Její zásadní negativní vlastnost je měkkost, proto se k mědi začaly přimíchávat různé jiné kovy a vznikaly tak slitiny (s cínem vytváří bronz, se zinkem mosaz) s mnohem lepšími vlastnostmi.¹⁵

3.2.1.2 Měď v průmyslu

Měď je dobře kujná a tažná, dobře elektricky a tepelně vodivá.¹⁵ Její dobrá tepelná vodivost se využívá například pro destilační zařízení, výměníky tepla, odparky, kotlíky v potravinářském průmyslu atp. Používá se ale i pro zařízení, kde teplota klesá k vysoce záporným hodnotám, protože si i zde zachovává svou houževnatost.¹⁶

Nejvíce mědi se spotřebuje v elektrotechnickém průmyslu, například k výrobě drátů, lan, ale zejména k výrobě elektrických vodičů.¹⁶

3.2.2 Měď v lidském organismu

V lidském těle je přítomno mezi 80-100 mg mědi.¹ Nachází se v různých množstvích v různých částech lidského těla. Nejvíce mědi najdeme v játrech.¹⁷ Dále pak ve vlasech, ledvinách, svalech, srdci či mozku.¹⁸

3.2.2.1 Kuproenzymy

Měď je nezbytnou složkou řady enzymů, které v těle zajišťují rozmanité funkce.¹⁹

Její významnou vlastností je, že se vyskytuje ve dvou rozdílných redoxních stavech: ve stavu oxidovaném (Cu^{2+}) jako ionty měďnaté a ve stavu redukovaném (Cu^{+}) jako ionty měďné. Díky

tomu funguje v organismu jako katalytický kofaktor enzymů. Mezi nejdůležitější metaloenzymy, pro které je měď nezbytná, patří např.:

1) Cu/Zn - superoxiddismutasa (SOD) - antioxidační aktivita

Existují tři typy: intracelulární (SOD1), extracelulární (SOD3) a mitochondriální (SOD2). Jak již bylo zmíněno, měď zde funguje jako katalyzátor, zinek je strukturální složkou.

2) Cytochrom c oxidasa (CCO) - energetický metabolismus

Nachází se na vnitřní membráně mitochondrií a skládá se ze třinácti bílkovinných podjednotek. Je posledním článkem dýchacího řetězce (přenos elektronů), kdy dochází k redukci kyslíku (O_2) na vodu (H_2O), a díky tomu je umožněna produkce ATP.

3) Ceruloplasmin = ferroxidasa I (CP) - homeostáza železa

Ceruloplasmin oxiduje železnaté ionty (Fe^{2+}) na železité (Fe^{3+}), které se mohou po vazbě na transferin pohybovat v organismu. CP tedy uvolňuje železo ze zásob v těle do krevní plasmy.

4) Lysyloxidasa (LOX) - vývoj pojivové tkáně

Je důležitá pro tvorbu, zesíťování a stabilizaci kolagenových a elastinových vláken.

5) Dopamin- β -hydroxylasa (DBH) - metabolismus katecholaminů

Umožňuje přeměnu dopaminu na noradrenalin.

6) Tyrosinasa (TYR) - syntéza melaninu - tvorba pigmentu.^{10, 20, 21}

3.2.2.2 Proteiny vázající měď

Měď je v organismu téměř vždy vázána na bílkovinný nosič.⁸ V krvi je nesena např.: albuminem nebo α_2 -makroglobulinem. Dále mohou proteiny, na které je vázána, sloužit jako její skladiště. K tomu slouží např.: metalothioneiny (MT).¹⁰

Ceruloplasmin je nejen oxidasa, která přeměňuje železnaté ionty na železité, čímž brání vzniku nebezpečného hydroxylového ($\cdot OH$) radikálu tzv. Fentonovou reakcí, ale zároveň slouží ke transportu mědi v plasmě.¹⁹

3.2.2.3 Fyziologické funkce mědi

Kromě již výše uvedených enzymů, pro jejichž fungování je měď naprosto nezbytná, zajišťuje v organismu i další funkce. Hraje klíčovou roli pro vývoj mozku. Dále má význam pro imunitní systém, protože je obsažena v mnoha protilátkách. Účastní se metabolismu glukózy a ovlivňuje i srážení krve přes faktor V a VIII.¹⁰

3.2.3 Farmakokinetika mědi

3.2.3.1 Příjem

Mezi nejvýznamnější zdroje mědi patří živočišné orgány (především játra), některé mořské plody (ústřice), kakaové boby, ořechy (především kešu) a různá semena.²²

Denní potřeba u dětí je 0,3-0,8 mg, u žen cca 1,5 mg a u mužů a těhotných či kojících žen až 2 mg za den.²³

2-3 mg/den jsou stále považovány za bezpečné, množství nad 5 mg/den už za toxické. Nicméně zdravý organismus vždy přijme jen aktuálně potřebné množství, zbytek vyloučí.²⁴

3.2.3.2 Absorpce

Míra absorpce závisí na množství mědi v potravě. Pokud je strava vysoce bohatá na měď, organismus absorbuje jen malé množství mědi, a naopak. Míra absorpce pak tedy může kolísat od 12 do 56 %.²⁴ Místem absorpce je tenké střevo a žaludek.²¹

Měď je přijímána z potravy převážně ve formě měďnatých kationtů. Pro vstřebání do krevního řečiště a následnou distribuci v organismu je nejprve nutná její přeměna na ionty měďné skrze redukci reduktasami ve střevě.²⁵ Literatura uvádí tyto tři: cytochrom b železnato/měďnatá reduktasa, STEAP2 metalloreduktasa a cytochrom b reduktasa 1.¹⁰

Do cytosolu enterocytů je měď přenesena přes speciální membránový transportér CTR1 (Copper transporter-1).¹⁰ V enterocytech je měď vázána mj. na metalothioneiny (MT), proteiny, které brání její absorpci a tím chrání organismus před případným poškozením nejen mědí, ale i dalšími toxickými kovy.²⁴ Měď je v enterocytech přenášena chaperony, specifickými proteiny, k dalším organelám a bazolaterální membráně. Odtud je pomocí speciální ATPasy (ATP7A) dopravena do krve.¹⁰

3.2.3.3 Distribuce a metabolismus

V krvi se měď po reakci s O_2 nachází opět ve stavu oxidovaném (Cu^{2+}), je vázaná na aminokyseliny (histidin), albumin, transkuprein nebo α_2 -makroglobulin, a v této podobě putuje do jater. Jakmile dorazí k hepatocytu, je nutná její přeměna zpět na měďné ionty a uvolnění z vazby na proteiny krevní plasmy.^{10, 7}

Dovnitř buňky se dostane opět prostřednictvím CTR1. Poté se znovu váže na chaperony, které měď přenesou k dalším organelám. Je popsáno několik typů chaperonů, např.: CCS, COX17, ATOX1. CCS dodává měď SOD1. COX17 dodává měď mitochondriím a zajišťuje začlenění do CCO. ATOX1 dopravuje měď do Golgiho aparátu, kde je zabudována do CP. Takto vázaná měď ve formě Cu^{2+} iontů putuje do systémového řečiště a dostává se k jednotlivým tkáním a orgánům. I v hepatocytech může být měď vázaná na MT, které pak slouží jako její skladiště.¹⁰

3.2.3.4 Exkrece

Z 98 % je měď z organismu vylučována žlučí, zbylá dvě procenta močí.²⁶ Denně je do žluči uvolněno 0,2 až 0,5 mg.²⁴

Měď je z hepatocytu vyloučena prostřednictvím speciální membránové ATPasy (ATP7B). Dojde k navázání na žlučové kyseliny. Tento komplex již není vstřebatelný, je transportován do střeva a měď je vyloučena stolicí z organismu ven.^{7, 10}

Vzhledem k tomu, že je měď vylučována žlučí, je její nadměrná akumulace v těle patrná u cholestázy.⁷

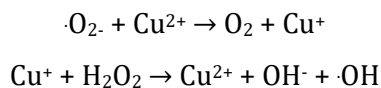
3.2.4 Homeostáza mědi

Existují dva hlavní regulační mechanismy, které zajišťují správné množství mědi v organismu. Je to regulace absorpce ze střeva a exkrece žlučí.¹⁰

Pokud je hladina mědi v organismu nízká, vzrůstá absorpce díky zvýšení počtu CTR1 na apikální a ATP7A na bazolaterální membráně enterocytu. Pokud je příjem mědi vysoký a organismus jí má dostatek, je navázána buď na MT ve střevě a tím se zabrání absorpci, nebo dochází k jejímu zvýšenému vylučování žlučí.¹⁰

Nejdůležitějším orgánem, který hraje ústřední roli v metabolismu mědi, jsou játra. Měď skladují (vázanou na MT), připravují ji k exkreci a zároveň zajišťují i její vazbu na CP.¹⁸

Kritický okamžik nastává, pokud měď není zabudovaná do žádného enzymu nebo zásobního proteinu, zůstává tedy volně v organismu. V tento moment může uvolňovat nebezpečné volné radikály, které dokážou poškodit řadu proteinů, nukleových kyselin a lipidů.^{20, 25} Měďné i měďnaté ionty se mohou podílet na vzniku těchto radikálů. V přítomnosti superoxidu ($\cdot\text{O}_2\cdot$) mohou být Cu^{2+} ionty redukovány na Cu^+ , které katalyzují vznik hydroxylového radikálu ($\cdot\text{OH}$). Tento proces shrnuje dvoustupňová Haber-Weissova reakce, která platí i pro ionty železa. (Obrázek č. 2):¹⁷



Obrázek č. 2: Haber-Weissova reakce

3.2.5 Nadbytek mědi v organismu

Nejčastěji je nadměrné množství mědi v potravě nebo vodě způsobeno jejím uvolněním z měděného nádobí nebo potrubí.¹

Akutní intoxikace se projevuje typickými příznaky otravy jako je nevolnost, zvracení, pocení, třes a silné pocity úzkosti.²³

Chronicky zvýšená měď v organismu se ukládá do tkání, především do jater a narušuje jejich funkci.²³

3.2.5.1 Wilsonova nemoc

Jedná se o specifické dědičné onemocnění s autozomálně recesivním přenosem, což znamená, že se projeví pouze u homozygotních jedinců.⁷

Podstatou onemocnění je mutace genu ATP7B, který kóduje membránové ATP7B proteiny transportující měď. Tento gen se nachází na třináctém chromozomu.^{10, 27} Při tomto onemocnění dochází k nadměrné akumulaci mědi v organismu, především v játrech, mozkových buňkách či ledvinách. Příčinou je snížená exkrece mědi do žluči.¹⁸

Problém nastává, pokud měď není vázaná na žádný enzym. Uvolňují se pak nebezpečné volné radikály. Dochází také k poklesu redukováného glutationu, což je hlavní ochránce buněk proti oxidativnímu poškození. Toxický vliv se projevuje především na mitochondriích, peroxizomech, mikrotubulech, příčných vazbách v DNA a na plazmatické membráně. Pro přežití buňky je určující přítomnost MT, které mohou měď na sebe navázat a zabránit tak jejímu toxickému působení.^{7, 18}

Celosvětová prevalence se pohybuje od 1:30 000 do 1:100 000. V České republice je to pak přibližně 1:71 000.^{18, 27} Objevuje se nejčastěji v mladším věku, kolem druhého desetiletí života, a je o něco častější u mužů.¹⁸

Onemocnění lze rozdělit na asymptomatickou a symptomatickou fázi. Dle symptomů se rozlišují tři základní formy: jaterní, neurologická a psychiatrická.¹⁸

Jaterní forma vede od primární bolestivosti přes akutní hepatitidu, cirhózu až k úplnému selhání jater. Neurologická forma je zpočátku špatně odhalitelná. Projevuje se bolestí hlavy, poruchami soustředění a spánku. Pro psychiatrickou formu jsou typické deprese, psychózy a změny nálad.

Měď se ukládá například i v rohovce, kde pak vytváří typický Kayser-Fleischerův modrozelený prstenec.²⁸

Co se týče léčby, je důležité včas rozpoznat samotné onemocnění. Léčba je pak účinnější. Mezi základní léčiva patří různé chelátory mědi, tedy látky které ji na sebe navážou a zvýší její vylučování. Mezi nejčastěji používané patří D-penicilamin, trientin, tetrathiomolybdenan amonný a soli zinku. S výhodou se využívá kombinační terapie.^{27, 28}

3.2.5.2 Alzheimerova choroba

Alzheimerova nemoc (AD) je chronické progresivní onemocnění způsobené degenerativním zánikem neuronů.²⁹ Je to nejčastější forma demence.²⁵ Není známá přímá vyvolávající příčina tohoto onemocnění. Nejčastěji se hovoří o tzv. amyloidní teorii.²⁴

V řadě studií bylo pozorováno, že lidé s AD trpěli zároveň poruchou metabolismu mědi.²⁴ Uvádí se, že při AD dochází k tomu, že specifický amyloidní protein váže a redukuje Cu^{2+} na Cu^+ , a ta pak způsobuje uvolnění nebezpečných radikálů, které ničí mozkové buňky.³⁰

3.2.6 Nedostatek mědi v organismu

Nedostatek mědi se vyskytuje jen výjimečně, např. při extrémní dietě či bulimii, a přirozeně při nadměrném krvácení. Typickými příznaky nedostatku jsou poruchy nervové soustavy, anémie, slabost, zhoršení odolnosti vůči nemocem, kornatění cév. Není potvrzeno, zdali nedostatek mědi přispívá ke vzniku aterosklerózy.¹

3.2.6.1 Menkesova choroba

Jedná se o dědičné onemocnění vázané na chromozom X. Většina nemocných jsou tedy chlapci.^{7, 10}

Vyvolávající příčinou je mutace genu ATP7A kódujícího membránové transportní ATP7A proteiny.¹⁰ Podstatou je, že organismus nedokáže přenášet měď ze střevní sliznice do krve. Tím dochází ke snížení aktivity metaloenzymů, které pro svoji funkci potřebují měď.¹⁸

Typickými projevy jsou slabý svalový tonus, záchvaty křečí, poruchy pojivové tkáně, mentální retardace a charakteristické vlnité vlasy.²⁴

Prevalence v evropských zemích se pohybuje od 1:300 000 do 1:360 000. Onemocnění se začíná vyvíjet už v kojeneckém věku a má velmi nepříznivou prognózu.^{10, 24}

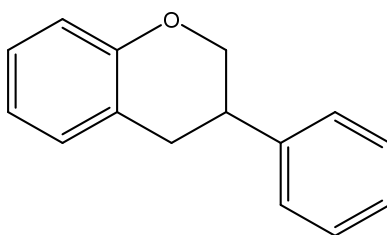
Nemocným se podává měď v komplexu s histidinem subkutánně. Zlepšuje to symptomy nemocných, nicméně pacienti obvykle do tří let zemřou.¹⁰

3.3 ISOFLAVONOIDY

Jedná se o přírodní polyfenolické látky patřící mezi sekundární metabolity rostlin.³¹

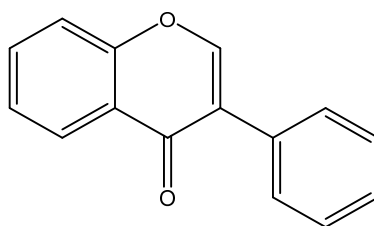
3.3.1 Chemická struktura

Jejich základní struktura je odvozena od 3-fenylchromanu (Obrázek č. 3). Od flavonoidů se odlišují tím, že benzenový kruh je připojen na chromanový kruh v poloze 3, nikoli v poloze 2.³¹

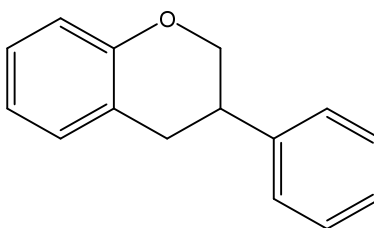


Obrázek č. 3: Základní struktura isoflavonoidů

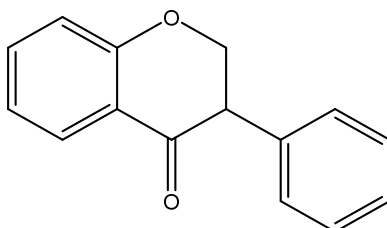
Isoflavonoidy se dle stupně oxidace pyranového kruhu dělí na isoflavony (Obrázek č. 4), isoflavany (Obrázek č. 5) a isoflavanony (Obrázek č. 6). V přírodě jsou nejvíce zastoupené isoflavony.³¹



Obrázek č. 4: Isoflavony



Obrázek č. 5: Isoflavany



Obrázek č. 6: Isoflavanony

3.3.2 Zástupci a výskyt

Mezi důležité zástupce látek patří genistein, daidzein, formononetin, glycitein a biochanin A.³¹

Isoflavonoidy jsou typické pro čeleď bobovité (Fabaceae). Nejbohatšími zdroji je sója luštinatá (*Glycine max* (L.) Merrill) a jetel luční (*Trifolium pratense* L.). Sójové boby (semena) obsahují isoflavony genistein, daidzein a glycitein. V jeteli se nachází isoflavon formononetin, biochanin A, daidzein a genistein.³¹

Dalšími zdroji isoflavonů jsou například mungo fazole z viny zlaté (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek), které obsahují 4',6,7 - trimethoxyisoflavon, daidzein, formononetin a genistein; jehlice trnitá (*Ononis spinosa* L.) ononin, formononetin, genistein a biochanin A.³²

Můžeme je najít i v jiných čeledích jako např. kosatcovitých (Iridaceae) u angínovníku čínskému (*Belamcanda chinensis* (L.) DC.), který obsahuje isoflavon tectorigenin.³² Vyskytují se také v různých zemědělsky využívaných rostlinách např. v tolici seté (*Medicago sativa* L.), podzemnici olejné (*Arachis hypogaea* L.), hrachu setém (*Pisum sativum* L.) nebo kukuřici seté (*Zea mays* L.), která je z čeledi lipnicovitých (Poaceae).³³

3.3.3 Vlastnosti a využití

Isoflavonoidy mají estrogenní i antiestrogenní účinky.³⁴ Jsou schopny vázat se především na estrogenní receptory β a vyvolávat účinky, které přirozeně vykazují endogenní estrogeny. Tato vlastnost je podmíněna podobnou strukturou nesteroidních isoflavonoidů a steroidních estrogenů. Používají se k mírnění symptomů vzniklých z nedostatku estrogenů při menopauze. Přispívají ke správnému metabolismu kostí.³¹

Zabraňují koronárním nemocem srdce, ateroskleróze či diabetu druhého typu. Snižují rizika vzniku určitých typů rakovin, především prsu a prostaty.³⁵

Jelikož se jedná také o polyfenolické sloučeniny, sdílí spolu s flavonoidy schopnost darovat vodík nebo elektron a působí tak jako antioxidanty, které neutralizují volné radikály. Další možností antioxidačního působení je chelatace iontů kovů.^{36, 37} Za určitých podmínek mají ale i negativní prooxidační účinky.³⁸

Podporují také snižování krevního tlaku a LDL-cholesterolu. Významná je jejich antiagregační aktivita.³²

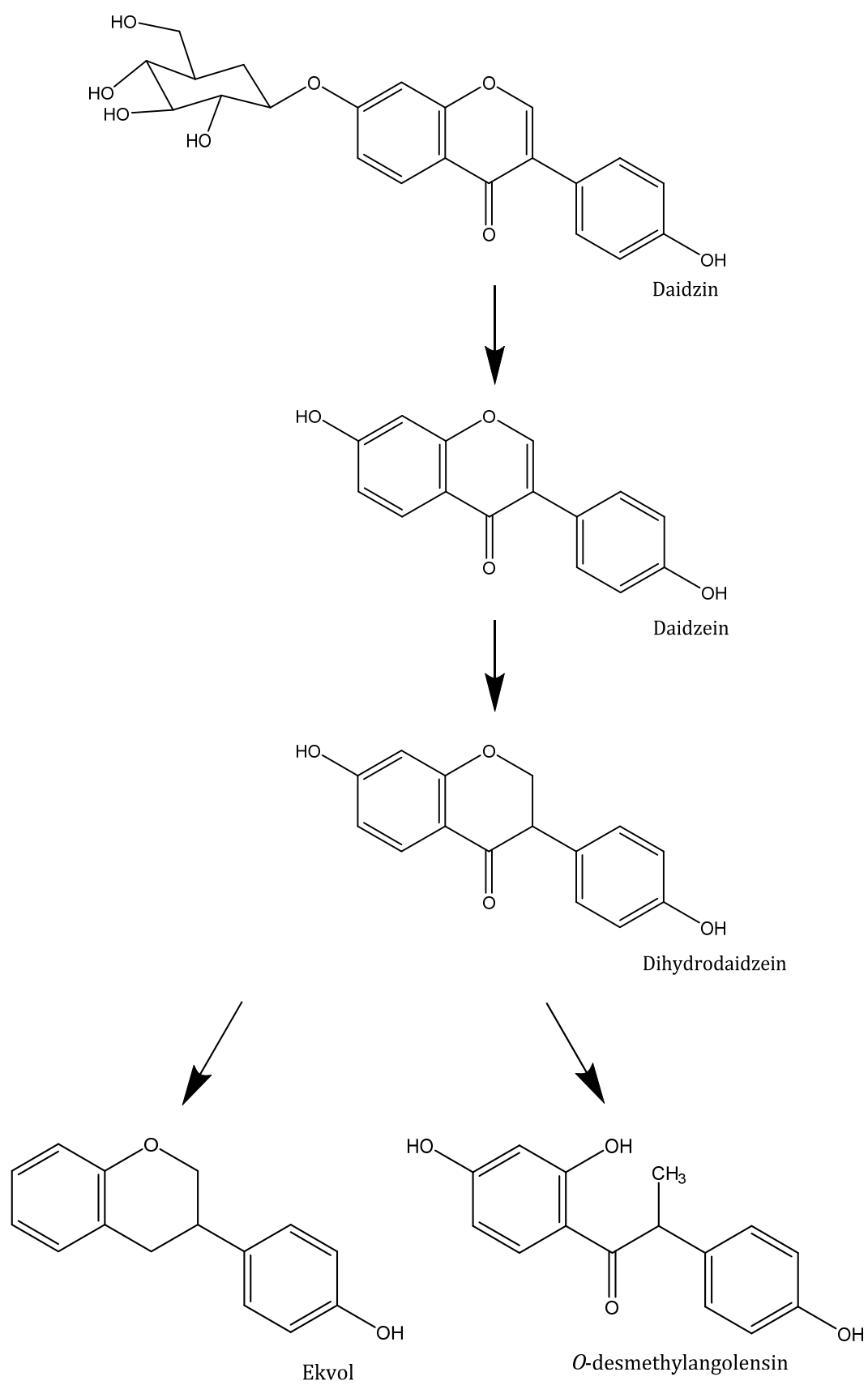
3.3.4 Metabolismus

V přírodních zdrojích mohou být isoflavonoidy volně nebo glykosidicky vázané přes kyslík v poloze 7 chromanového kruhu. Nejčastěji jsou navázány na glukózu. Jsou zde tedy v podobě genistinu, daidzinu a glycetinu.^{33, 34}

Před vstřebáním do systémové cirkulace prochází isoflavonoidy rozsáhlým metabolismem a právě tyto metabolity nesou příslušné biologické účinky.³⁹

Nejprve je nutno rozštěpit glykosidickou vazbu a uvolnit tak aktivní aglykony - genistein, daidzein a glycitein. K tomu dochází už v dutině ústní a pokračuje v tenkém střevě glukosidasami. Bakterie tlustého střeva metabolizují daidzein na dihydrodaidzein, který se pak dále přeměňuje na ekvol nebo *o*-desmethylangolensin. V játrech dochází k hydroxylaci a reakci s kyselinou glukuronovou nebo sulfonovou. Vznikají tak hydrofilnější deriváty, které jsou z organismu vyloučeny močí. Jen malé množství absorbovaných aglykonů putuje do enterohepatální cirkulace.^{33, 34, 35}

V této práci se věnuji ekvolu a desmethylangolensinu, proto na tomto místě uvádím přeměnu jejich výchozí látky daidzinu (Obrázek č. 7).³⁵

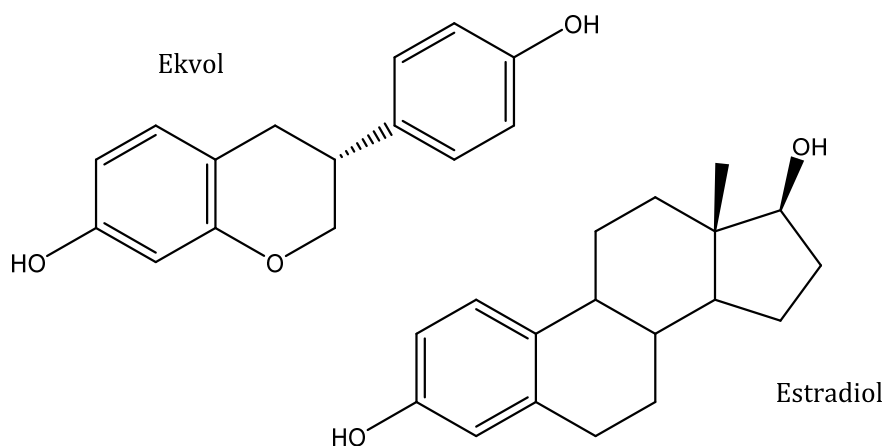


Obrázek č. 7: Schéma přeměny glykosidu daidzinu na jednotlivé metabolity

3.3.5 Testované látky

3.3.5.1 Ekvol

Ekvol (4',7-dihydrodxyisoflavan) je polyfenolická sloučenina. Jedná se o metabolit přírodního daidzeinu. Ve své molekule obsahuje jedno centrum chiralitu na C₃. Existuje ve dvou enantiomerních formách *R* a *S*. Výhradně *S*-ekvol je produkován střevní mikroflórou. Zajímavostí je, že pouze jedna třetina populace ho dokáže produkovat ve větším množství. Tato schopnost je závislá na složení střevní mikroflóry. Ekvol má vyšší estrogení potenciál než desmethylangolensin, protože vykazuje vysokou podobnost s tělu přirozeným hormonem estradiolem (Obrázek č. 8).^{34, 40} Je zároveň nejsilnějším antioxidantem ve skupině isoflavonoidů.³⁶



Obrázek č. 8: Porovnání struktury ekvolu a estradiolu

3.3.5.2 Desmethylangolensin

O-desmethylangolensin (DMA) je druhý metabolit daidzeinu. Na rozdíl od ekvolu či daidzeinu má ale jeden kruh rozštěpen. Tím pádem se snižuje strukturální podobnost s estradiolem a uvádí se, že má i menší estrogení účinky.⁴¹

Stejně jako ekvol, i DMA dokáží produkovat jen někteří jedinci. Studie uvádí, že DMA produkuje více než 80 % populace, zatímco ekvol jen 25-60 %.^{41, 42}

V organismu se vyskytuje jako volný aglykon nebo ve formě mono-, diglukuronidu či sulfátu. Studie potvrzují, že glukuronidy mají menší aktivitu než aglykony.⁴¹

3.4 CHELATAČE

Chelatační schopnosti látek se využívá při intoxikaci a přetížení organismu toxickými kovy. Cílem chelatace je odstranit toxické ionty kovů z postižených orgánů. Je zapotřebí, aby afinita chelatačního činidla pro kovové ionty byla vyšší než afinita kovových iontů k buněčným strukturám.⁴³

3.5 REDUKCE

Schopnost látek redukovat ionty různých kovů může být za určitých podmínek pro organismus nebezpečná, protože právě redukované ionty podporují vznik volných radikálů Fentonovou reakcí. Zvýšené uvolňování těchto nebezpečných volných radikálů vede k poškozování buněčných struktur.⁴⁴

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 MATERIÁL

Automatické pipety o různém objemu (Brand)

Vícekanálové pipety o různém objemu (Biohit)

Mikrotitrační destičky (Brand)

4.2 VYUŽÍVANÉ PŘÍSTROJE

Analytické váhy KERN ABT 120-5DM (KERN & Sohn GmbH, Balingen, Germany)

Třepačka pro mikrotitrační destičky IKA MS 3 digital (IKA®-Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Germany)

Třepačka pro zkumavky IKA VORTEX GENIUS 3 (IKA®-Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Germany)

Laboratorní ultrazvuková vana K-2L (Kraintek, s. r. o., Podhájska, Slovensko)

Spektrofotometr pro mikrotitrační destičky SYNERGY HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTec Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)

4.3 POUŽÍVANÉ CHEMIKÁLIE

4.3.1 Chemikálie pro měření s ionty železa

Heptahydrát síranu železnatého ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Penta)

Hexahydrát chloridu železitého ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Penta)

Hydroxylamin hydrochlorid (HA) (Sigma-Aldrich)

Ferrozín (disodná sůl 4,4'-(3-(2-pyridinyl)-1,2,4-triazin-5,6-diyl)bisbenzensulfonové kyseliny) (Fluka)

Dimethylsulfoxid (DMSO) (Lach-Ner)

Ultračistá voda (Milli-Q RG, Merck Millipore, Massachusetts, USA)

15 mM acetátové pufrý o pH 4,5 a 5,5:

Kyselina octová (CH_3COOH) (Penta)

Octan sodný bezvodý (CH_3COONa) (Penta)

Ultračistá voda (Milli-Q RG, Merck Millipore, Massachusetts, USA)

15 mM HEPES pufrý o pH 6,8 a 7,5:

HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin ethansulfonová kyselina) (Sigma-Aldrich)

HEPES sůl (sodná sůl kyseliny 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin ethansulfonové) (Sigma-Aldrich)

Ultračistá voda (Milli-Q RG, Merck Millipore, Massachusetts, USA)

4.3.2 Chemikálie pro měření s ionty mědi

Chlorid měďný (CuCl) (Sigma-Aldrich)

Pentahydrát síranu měďnatého (CuSO₄·5H₂O) (Sigma-Aldrich)

Hydroxylamin hydrochlorid (HA) (Sigma-Aldrich)

Disodná sůl kyseliny bathocuproindisulfonové (BCS) (Sigma-Aldrich)

Hematoxylin (HEM) (Sigma-Aldrich)

Dimethylsulfoxid (DMSO) (Lach-Ner)

Ultračistá voda (Milli-Q RG, Merck Millipore, Massachusetts, USA)

15 mM acetátové pufrý o pH 4,5 a 5,5:

Kyselina octová (CH₃COOH) (Penta)

Octan sodný bezvodý (CH₃COONa) (Penta)

Ultračistá voda (Milli-Q RG, Merck Millipore, Massachusetts, USA)

15 mM HEPES pufrý o pH 6,8 a 7,5:

HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin ethansulfonová kyselina) (Sigma-Aldrich)

HEPES sůl (sodná sůl kyseliny 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin ethansulfonové) (Sigma-Aldrich)

Ultračistá voda (Milli-Q RG, Merck Millipore, Massachusetts, USA)

Všechny používané látky byly v čistotě p.a.

4.4 TESTOVANÉ LÁTKY

R,S-equol (98%) (Toronto Research Chemicals, Toronto, Canada)

O-desmethylangolensin (DMA) (Katedra organické a bioorganické chemie, FaF UK)

4.5 VYUŽÍVANÉ PROGRAMY

Veškeré vyobrazené molekuly byly vytvořeny v programu ChemDraw Professional 17.1.

Pro zpracování naměřených výsledků do grafů byl využit program GraphPad verze 7.

4.6 METODIKA PRO MĚŘENÍ S IONTY ŽELEZA

4.6.1 Příprava základních a pracovních roztoků a vzorků testovaných látek

4.6.1.1 Příprava základního a pracovního roztoku železnatých iontů

Nejprve byl připraven základní roztok železnatých iontů o koncentraci 5 mM rozpuštěním heptahydrátu síranu železnatého ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $M_w = 278,02 \text{ g/mol}$) v ultračisté vodě.

Pro další měření byl tento základní roztok zředěn ultračistou vodou na roztok pracovní o koncentraci 250 μM .

4.6.1.2 Příprava základního a pracovního roztoku železitých iontů

Nejprve byl připraven základní roztok železitých iontů o koncentraci 5 mM rozpuštěním hexahydrátu chloridu železitého ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $M_w = 270,3 \text{ g/mol}$) v ultračisté vodě.

Pro další měření byl tento základní roztok zředěn ultračistou vodou v čas potřeby na roztok pracovní o koncentraci 250 μM .

4.6.1.3 Příprava základního indikačního roztoku ferrozinu

Byl připraven základní roztok ferrozinu o koncentraci 5 mM rozpuštěním disodné soli 4,4'-(3-(2-pyridinyl)-1,2,4-triazin-5,6-diyl)bisbenzensulfonové kyseliny ($M_w = 492,5 \text{ g/mol}$) v ultračisté vodě.

Při měření byl roztok ferrozinu využit jako barevný indikátor.

4.6.1.4 Příprava základního a pracovního roztoku hydroxylamin hydrochloridu

Nejprve byl připraven základní roztok hydroxylamin hydrochloridu o koncentraci 100 mM rozpuštěním hydroxylamin hydrochloridu ($\text{HONH}_2 \cdot \text{HCl}$, $M_w = 69,49 \text{ g/mol}$) v ultračisté vodě.

Pro další měření byl tento základní roztok zředěn ultračistou vodou na roztok pracovní o koncentraci 10 mM.

Při měření byl roztok hydroxylamin hydrochloridu využit jako redukční činidlo.

4.6.1.5 Příprava vzorků testovaných látek

Vzorky testovaných látek o požadovaných koncentracích byly připraveny rozpuštěním daných látek v DMSO.

4.6.2 Kontrolní zkouška roztoků iontů železa

4.6.2.1 Kontrolní zkouška roztoku železnatých iontů

Po připravení pracovního roztoku železnatých iontů o koncentraci 250 μM byla provedena kontrola správného ředění.

- Do jamky na mikrotitrační destičce bylo pipetováno:
 - 100 μl DMSO
 - 50 μl roztoku Fe^{2+} iontů o koncentraci 250 μM
 - 50 μl roztoku ferrozinu o koncentraci 5 mM.
- Mikrotitrační destička byla ihned vložena do spektrofotometru a byla měřena absorbance při vlnové délce 562 nm.
- Pokud se hodnota naměřené absorbance blížila jedné, kontrolní zkouška byla považována za pozitivní a roztok mohl být použit k dalšímu měření.

4.6.2.2 Kontrolní zkouška roztoku železitých iontů

Po připravení čerstvého pracovního roztoku Fe^{3+} iontů o koncentraci 250 μM byla provedena kontrola správného ředění.

- Do jamky na mikrotitrační destičce bylo pipetováno:
 - 100 μl DMSO
 - 50 μl roztoku Fe^{3+} iontů o koncentraci 250 μM
 - 50 μl roztoku HA o koncentraci 10 mM
 - 50 μl roztoku ferrozinu o koncentraci 5 mM.
- Mikrotitrační destička byla ihned vložena do spektrofotometru a byla změřena absorbance při vlnové délce 562 nm.
- Pokud se hodnota naměřené absorbance blížila jedné, kontrolní zkouška byla považována za pozitivní a roztok mohl být použit k dalšímu měření.

4.6.3 Kalibrace železnatých iontů





Pro interpretaci výsledků bylo nutné sestavit kalibrační křivku závislosti absorpance na koncentraci železnatých iontů.

- Ze základního roztoku železnatých iontů byly naředěny ultračistou vodou pracovní roztoky o koncentracích 75, 150, 250, 500 a 750 μM .
- Do všech určených jamek na mikrotitrační destičce bylo pipetováno 150 μl ultračisté vody.
- Do testovacích jamek bylo následně pipetováno 50 μl roztoku Fe^{2+} iontů příslušné koncentrace.

Do jamek kontrolních bylo pipetováno 50 μl rozpouštědla - ultračisté vody.

- Na závěr bylo přidáno do horní poloviny jamek 50 μl indikačního roztoku ferrozinu a do dolní poloviny jamek 50 μl rozpouštědla - ultračisté vody.
- Ihned byla měřena absorpance při vlnové délce 562 nm.
- Z výsledků byla sestrojena kalibrační křivka.
- Obrázek č. 9 ukazuje schematické zobrazení jamek destičky při tomto stanovení.

	$c(\text{Fe}^{2+})$ = 0 μM	$c(\text{Fe}^{2+})$ = 75 μM	$c(\text{Fe}^{2+})$ = 150 μM	$c(\text{Fe}^{2+})$ = 250 μM	$c(\text{Fe}^{2+})$ = 500 μM	$c(\text{Fe}^{2+})$ = 750 μM
Jamky s indikátorem						
Slepé vzorky						

	Kontrolní jamky (ultračistá voda bez Fe^{2+} iontů)
	Testovací jamky (roztoky Fe^{2+} iontů)
	Jamky s indikátorem (roztok ferrozinu)
	Slepé vzorky (ultračistá voda)





Konečný obsah jamek:
150 μl ultračisté vody
50 μl roztoku Fe^{2+} iontů nebo ultračisté vody
50 μl roztoku ferrozinu nebo ultračisté vody

Obrázek č. 9: Schematické zobrazení jamek mikrotitrační destičky pro sestavení kalibrační křivky železnatých iontů

4.6.4 Chelatace železnatých iontů

- Do všech určených jamek na mikrotitrační destičce bylo pipetováno 150 μl příslušného pufru.
- Do testovacích jamek bylo následně pipetováno 50 μl roztoku testované látky příslušné koncentrace.
Do jamek kontrolních bylo pipetováno 50 μl rozpouštědla - DMSO.
- Pouze při měření v prostředí o pH 7,5 bylo navíc do všech jamek přidáno 50 μl roztoku HA o koncentraci 10 mM.
- Dále bylo do všech jamek pipetováno 50 μl roztoku Fe^{2+} iontů o koncentraci 250 μM .
- Mikrotitrační destička byla třepána po dobu dvou minut na třepáčce.
- Na závěr bylo přidáno do horní poloviny jamek 50 μl indikačního roztoku ferrozinu a do dolní poloviny jamek 50 μl ultračisté vody (slepé vzorky).
- Ihned byla měřena absorbance při vlnové délce 562 nm. Následně byla absorbance proměřena znovu v čase 5 min při stejné vlnové délce.
- Obrázek č. 10 ukazuje schematické zobrazení jamek destičky při tomto stanovení.

	Roztok testované látky $c_1 = 10 \text{ mM}$	Roztok testované látky $c_2 = 1 \text{ mM}$	Roztok testované látky $c_3 = 0,1 \text{ mM}$	Kontrolní jamky DMSO
Jamky s indikátorem				
Slepé vzorky				

	Testovací jamky (roztoky testované látky)
	Kontrolní jamky (DMSO)
	Jamky s indikátorem (roztok ferrozinu)
	Slepé vzorky (ultračistá voda)

Konečný obsah jamek:
150 μl pufru
50 μl roztoku testované látky nebo DMSO
50 μl roztoku Fe^{2+} iontů
50 μl roztoku ferrozinu nebo ultračisté vody
+50 μl roztoku HA pro pH 7,5

Obrázek č. 10: Schematické zobrazení jamek mikrotitrační destičky při měření chelatace železnatých iontů

4.6.5 Chelatace železitých iontů

- Do všech určených jamek na mikrotitrační destičce bylo pipetováno 150 μl pufru o pH 4,5.
- Do testovacích jamek bylo následně pipetováno 50 μl roztoku testované látky příslušné koncentrace.





Do jamek kontrolních bylo pipetováno 50 μl rozpouštědla - DMSO.

- V čas potřeby byl ze základního roztoku Fe^{3+} iontů připraven pracovní roztok Fe^{3+} iontů o koncentraci 250 μM .

50 μl tohoto čerstvého roztoku Fe^{3+} iontů bylo po kontrole přidáno do všech jamek.

- Mikrotitrační destička byla třepána po dobu dvou minut na třepáče.
- Dále bylo do všech jamek pipetováno 50 μl HA o koncentraci 10 mM.
- Mikrotitrační destička byla třepána po dobu jedné minuty na třepáče.
- Na závěr bylo přidáno do horní poloviny jamek 50 μl indikačního roztoku ferrozinu a do dolní poloviny jamek 50 μl ultračisté vody (slepé vzorky).
- Ihned byla měřena absorbance při vlnové délce 562 nm. Následně byla absorbance proměřena znovu v čase 5 min při stejné vlnové délce.
- Obrázek č. 11 ukazuje schematické zobrazení jamek destičky při tomto stanovení.

	Roztok testované látky $c_1 = 10 \text{ mM}$	Roztok testované látky $c_2 = 1 \text{ mM}$	Roztok testované látky $c_3 = 0,1 \text{ mM}$	Kontrolní jamky DMSO
Jamky s indikátorem				
Slepé vzorky				





	Testovací jamky (roztoky testované látky)	Konečný obsah jamek: 150 μl pufru pH 4,5 50 μl roztoku testované látky nebo DMSO 50 μl roztoku Fe^{3+} iontů 50 μl roztoku HA 50 μl roztoku ferrozinu nebo ultračisté vody
	Kontrolní jamky (DMSO)	
	Jamky s indikátorem (roztok ferrozinu)	
	Slepé vzorky (ultračistá voda)	

Obrázek č. 11: Schematické zobrazení jamek mikrotitrační destičky při měření chelatace železitých iontů

4.6.6 Redukce železitých iontů

- Do všech testovacích jamek bylo pipetováno 150 μl příslušného pufru.
Do jamek kontrolních bylo pipetováno 150 μl pufru vždy o pH 4,5.
- Do testovacích jamek bylo následně pipetováno 50 μl roztoku testované látky příslušné koncentrace nebo 50 μl rozpouštědla - DMSO.
Do jamek kontrolních bylo pipetováno 50 μl roztoku HA o koncentraci 10 mM.
- V čas potřeby byl ze základního roztoku Fe^{3+} iontů připraven pracovní roztok Fe^{3+} iontů o koncentraci 250 μM .
50 μl tohoto čerstvého roztoku Fe^{3+} iontů bylo po kontrole přidáno do všech jamek.
- Mikrotitrační destička byla třepána po dobu dvou minut na třepáče.
- Na závěr bylo přidáno do horní poloviny jamek 50 μl indikačního roztoku ferrozinu a do dolní poloviny jamek 50 μl ultračisté vody (slepé vzorky).
- Ihned byla měřena absorbance při vlnové délce 562 nm. Následně byla absorbance proměřena znovu v čase 5 min při stejné vlnové délce.
- Obrázek č. 12 ukazuje schematické zobrazení jamek destičky při tomto stanovení.

	Roztok testované látky $c_1 = 10 \text{ mM}$	Roztok testované látky $c_2 = 1 \text{ mM}$	Roztok testované látky $c_3 = 0,1 \text{ mM}$	Rozpouštědlo DMSO	Kontrolní jamky HA
Jamky s indikátorem					
Slepé vzorky					

	Testovací jamky (roztoky testované látky nebo DMSO)
	Kontrolní jamky (roztok HA)
	Jamky s indikátorem (roztok ferrozinu)
	Slepé vzorky (ultračistá voda)

Konečný obsah jamek:

150 μl pufru nebo pufru pH 4,5

50 μl roztoku testované látky nebo DMSO nebo roztoku HA

50 μl roztoku Fe^{3+} iontů

50 μl roztoku ferrozinu nebo ultračisté vody

Obrázek č. 12: Schematické zobrazení jamek mikrotitrační destičky při měření redukce železitých iontů

4.7 METODIKA PRO MĚŘENÍ S IONTY MĚDI

4.7.1 Příprava základních a pracovních roztoků a vzorků testovaných látek

4.7.1.1 Příprava základního a pracovního roztoku měďných iontů

Nejprve byl připraven základní roztok měďných iontů o koncentraci 5 mM rozpuštěním chloridu měďného (CuCl , $M_w = 98,99 \text{ g/mol}$) ve vodném roztoku 0,1M kyseliny chlorovodíkové (HCl , $M_w = 36,46 \text{ g/mol}$) a 1M chloridu sodného (NaCl , $M_w = 58,44 \text{ g/mol}$) v ultrazvukové lázni.

Pro další měření byl tento základní roztok zředěn dimethylsulfoxidem (DMSO) na roztok pracovní o koncentraci 250 μM .

4.7.1.2 Příprava základního a pracovního roztoku měďnatých iontů

Nejprve byl připraven základní roztok měďnatých iontů o koncentraci 5 mM rozpuštěním pentahydrátu síranu měďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $M_w = 249,69 \text{ g/mol}$) v ultračisté vodě.

Pro další měření byl tento základní roztok zředěn dimethylsulfoxidem (DMSO) na roztok pracovní o koncentraci 250 μM .

4.7.1.3 Příprava základního indikačního roztoku bathocuproindisulfonové kyseliny (BCS)

Byl připraven základní roztok BCS o koncentraci 5 mM rozpuštěním disodné soli bathocuproindisulfonové kyseliny ($M_w = 564,54 \text{ g/mol}$) v ultračisté vodě.

Při měření byl roztok BCS využit jako barevný indikátor.

4.7.1.4 Příprava základního a pracovního indikačního roztoku hematoxylinu

Nejprve byl připraven základní roztok hematoxylinu o koncentraci 5 mM rozpuštěním hematoxylinu ($M_w = 302,28 \text{ g/mol}$) v DMSO . Použitelnost tohoto základního roztoku byla stanovena na dobu cca 5 hodin.

Pro další měření byl tento základní roztok zředěn dimethylsulfoxidem (DMSO) na roztok pracovní o koncentraci 250 μM . Použitelnost tohoto pracovního roztoku byla stanovena na dobu 90 minut.

Při měření byl roztok hematoxylinu využit jako barevný indikátor.

4.7.1.5 Příprava základního a pracovního roztoku hydroxylamin hydrochloridu

Nejprve byl připraven základní roztok hydroxylamin hydrochloridu o koncentraci 100 mM rozpuštěním hydroxylamin hydrochloridu ($\text{HONH}_2 \cdot \text{HCl}$, $M_w = 69,49 \text{ g/mol}$) v ultračisté vodě.

Pro další měření byl tento základní roztok zředěn ultračistou vodou na roztoky pracovní o koncentraci 10 mM a 1mM.

Při měření byl roztok hydroxylamin hydrochloridu využit jako redukční činidlo.

4.7.1.6 Příprava vzorků testovaných látek

Vzorky testovaných látek o požadovaných koncentracích byly připraveny rozpuštěním daných látek v DMSO.

4.7.2 Kontrolní zkouška roztoků iontů mědi

Zkouška správného ředění byla prováděna vždy po přípravě základních roztoků měďných a měďnatých iontů. Byla prováděna pouze před jejich prvním použitím, poněvadž si roztoky ponechávaly svou stabilitu. Byly uchovávány v lednici.

- Do dvou jamek pod sebe na mikrotitrační destičce bylo pipetováno:
 - 150 μ l pufru o pH 7,5
 - 50 μ l roztoku HA o koncentraci 1 mM
 - 50 μ l roztoku iontů mědi o koncentraci 250 μ M
- Mikrotitrační destička byla třepána po dobu jedné minuty na třepáče.
 - 50 μ l roztoku BCS o koncentraci 5 mM
- Mikrotitrační destička byla po uplynutí minimálně jedné minuty vložena do spektrofotometru a byla změřena absorbance při vlnové délce 484 nm.
- Pokud se hodnota naměřené absorbance pohybovala okolo 0,50-0,55, kontrolní zkouška byla považována za pozitivní a roztoky mohly být použity k dalšímu měření.

4.7.3 Kalibrace měďnatých iontů





Pro interpretaci výsledků bylo nutné sestavit kalibrační křivku závislosti absorpance na koncentraci měďnatých iontů.

- Ze základního roztoku měďnatých iontů byly naředěny ultračistou vodou pracovní roztoky o koncentracích 50, 100, 150, 200 a 250 μM .
- Do všech určených jamek na mikrotitrační destičce bylo pipetováno 150 μl pufru o pH 6,8.
- Poté bylo do všech jamek pipetováno 50 μl roztoku HA o koncentraci 1 mM.
- Do testovacích jamek bylo následně pipetováno 50 μl roztoku Cu^{2+} iontů příslušné koncentrace.

Do jamek kontrolních bylo pipetováno 50 μl rozpouštědla - ultračisté vody.

- Mikrotitrační destička byla třepána po dobu jedné minuty na třepače.
- Na závěr bylo přidáno do horní poloviny jamek 50 μl indikačního roztoku BCS a do dolní poloviny jamek 50 μl rozpouštědla - ultračisté vody.
- Ihned byla měřena absorpance při vlnové délce 484 nm. Následně byla absorpance proměřena znovu v čase 5 min.
- Z výsledků byla sestrojena kalibrační křivka.
- Obrázek č. 13 ukazuje schematické zobrazení jamek destičky při tomto stanovení

	$c(\text{Cu}^{2+})$ = 0 μM	$c(\text{Cu}^{2+})$ = 50 μM	$c(\text{Cu}^{2+})$ = 100 μM	$c(\text{Cu}^{2+})$ = 150 μM	$c(\text{Cu}^{2+})$ = 200 μM	$c(\text{Cu}^{2+})$ = 250 μM
Jamky s indikátorem						
Slepé vzorky						

	Kontrolní jamky (ultračistá voda bez Cu^{2+} iontů)
	Testovací jamky (roztoky Cu^{2+} iontů)
	Jamky s indikátorem (roztok BCS)
	Slepé vzorky (ultračistá voda)

Konečný obsah jamek:
150 μl pufru pH 6,8
50 μl roztoku HA
50 μl roztoku Cu^{2+} iontů nebo ultračisté vody
50 μl roztoku BCS nebo ultračisté vody

Obrázek č. 13: Schematické zobrazení jamek mikrotitrační destičky pro sestrojení kalibrační křivky měďnatých iontů

4.7.4 Chelatace iontů mědi hematoxylinem

- Do všech určených jamek na mikrotitrační destičce bylo pipetováno 150 μl příslušného pufru.
- Poté bylo do všech jamek pipetováno 50 μl vodného roztoku Cu^{2+} iontů o koncentraci 250 μM .
- Do testovacích jamek bylo následně pipetováno 50 μl roztoku testované látky příslušné koncentrace.





Do jamek kontrolních bylo pipetováno 50 μl rozpouštědla - DMSO.

- Mikrotitrační destička byla třepána po dobu dvou minut na třepačce.
- Poté bylo přidáno do horní poloviny jamek 50 μl indikačního roztoku hematoxylinu a do dolní poloviny jamek 50 μl DMSO (slepé vzorky).
- Mikrotitrační destička byla třepána po dobu třech minut na třepačce.
- Ihned (tzn. v čase 3 min) byla měřena absorbance při různých vlnových délkách pro různá pH: 610 nm (pH 7,5)/ 590 nm (pH 6,8)/ 595 nm (pH 5,5).

Následně byla absorbance proměřena znovu v čase 7 min při stejné vlnové délce.

- Obrázek č. 14 ukazuje schematické zobrazení jamek destičky při tomto stanovení

	Roztok testované látky C_1	Roztok testované látky C_2	Roztok testované látky C_x	Kontrolní jamky DMSO
Jamky s indikátorem				
Slepé vzorky				

	Testovací jamky (roztoky testované látky)	Konečný obsah jamek: 150 μl pufru 50 μl roztoku Cu^{2+} iontů 50 μl roztoku testované látky nebo DMSO 50 μl roztoku HEM nebo DMSO
	Kontrolní jamky (DMSO)	
	Jamky s indikátorem (roztok hematoxylinu)	
	Slepé vzorky (DMSO)	

Obrázek č. 14: Schematické zobrazení jamek mikrotitrační destičky při měření chelatace iontů mědi hematoxylinem





4.7.5 Chelatace měďných iontů

- Do všech určených jamek na mikrotitrační destičce bylo pipetováno 100 μl příslušného pufru.
- Následně bylo do všech jamek pipetováno 50 μl roztoku HA. Pro prostředí o pH 6,8 a 7,5 byl použit roztok o koncentraci 1 mM; pro prostředí o pH 4,5 a 5,5 byl použit roztok o koncentraci 10 mM.
- Poté bylo do všech jamek přidáno 50 μl roztoku Cu^{2+} iontů v DMSO o koncentraci 250 μM .
- Mikrotitrační destička byla třepána po dobu jedné minuty na třepačce.
- Do testovacích jamek bylo následně pipetováno 50 μl roztoku testované látky příslušné koncentrace.

Do jamek kontrolních bylo pipetováno 50 μl rozpouštědla - DMSO.

- Mikrotitrační destička byla třepána po dobu dvou minut na třepačce.
- Na závěr bylo přidáno do horní poloviny jamek 50 μl indikačního roztoku BCS a do dolní poloviny jamek 50 μl ultračisté vody (slepé vzorky).
- Ihned byla měřena absorbance při vlnové délce 484 nm. Následně byla absorbance proměřena znovu v čase 5 min při stejné vlnové délce.
- Obrázek č. 15 ukazuje schematické zobrazení jamek destičky při tomto stanovení.

	Roztok testované látky c_1	Roztok testované látky c_2	Roztok testované látky c_x	Kontrolní jamky DMSO
Jamky s indikátorem				
Slepé vzorky				

	Testovací jamky (roztoky testované látky)
	Kontrolní jamky (DMSO)
	Jamky s indikátorem (roztok BCS)
	Slepé vzorky (ultračistá voda)

Konečný obsah jamek:





100 μl pufru
 50 μl roztoku HA
 50 μl roztoku Cu^+ iontů
 50 μl roztoku testované látky nebo DMSO
 50 μl roztoku BCS nebo ultračisté vody

Obrázek č. 15: Schematické zobrazení jamek mikrotitrační destičky při měření chelatace měďných iontů

4.7.6 Chelatace měďnatých iontů

- Do všech určených jamek na mikrotitrační destičce bylo pipetováno 100 μl příslušného pufru.
- Do testovacích jamek bylo následně pipetováno 50 μl roztoku testované látky příslušné koncentrace.
Do jamek kontrolních bylo pipetováno 50 μl rozpouštědla - DMSO.
- Poté bylo do všech jamek pipetováno 50 μl roztoku Cu^{2+} iontů v DMSO o koncentraci 250 μM .
- Mikrotitrační destička byla třepána po dobu dvou minut na třepačce.
- Poté bylo do všech jamek přidáno 50 μl roztoku HA. Pro prostředí o pH 6,8 a 7,5 byl použit roztok o koncentraci 1 mM; pro prostředí o pH 4,5 a 5,5 byl použit roztok o koncentraci 10 mM.
- Mikrotitrační destička byla třepána po dobu jedné minuty na třepačce.
- Na závěr bylo přidáno do horní poloviny jamek 50 μl indikačního roztoku BCS a do dolní poloviny jamek 50 μl ultračisté vody (slepé vzorky).
- Ihned byla měřena absorbance při vlnové délce 484 nm. Následně byla absorbance proměřena znovu v čase 5 min při stejné vlnové délce.
- Obrázek č. 16 ukazuje schematické zobrazení jamek destičky při tomto stanovení.

	Roztok testované látky c_1	Roztok testované látky c_2	Roztok testované látky c_x	Kontrolní jamky DMSO
Jamky s indikátorem				
Slepé vzorky				

	Testovací jamky (roztoky testované látky)
	Kontrolní jamky (DMSO)
	Jamky s indikátorem (roztok BCS)
	Slepé vzorky (ultračistá voda)





Konečný obsah jamek:
100 μl pufru
50 μl roztoku testované látky nebo DMSO
50 μl roztoku Cu^{2+} iontů
50 μl roztoku HA
50 μl roztoku BCS nebo ultračisté vody

Obrázek č. 16: Schematické zobrazení jamek mikrotitrační destičky při měření chelatace měďnatých iontů

4.7.7 Redukce měďnatých iontů

- Do všech určených jamek na mikrotitrační destičce bylo pipetováno 100 μl příslušného pufru.
- Do testovacích jamek bylo následně pipetováno 50 μl roztoku testované látky příslušné koncentrace nebo 50 μl rozpouštědla - DMSO.
Do jamek kontrolních bylo pipetováno 50 μl roztoku HA. Pro prostředí o pH 6,8 a 7,5 byl použit roztok o koncentraci 1 mM; pro prostředí o pH 4,5 a 5,5 byl použit roztok o koncentraci 10 mM.
- Poté bylo do všech jamek přidáno 50 μl roztoku Cu^{2+} iontů v DMSO o koncentraci 250 μM .
- Mikrotitrační destička byla třepána po dobu dvou minut na třepačce.
- Na závěr bylo přidáno do horní poloviny jamek 50 μl indikačního roztoku BCS a do dolní poloviny jamek 50 μl ultračisté vody (slepé vzorky).
- Ihned byla měřena absorbance při vlnové délce 484 nm. Následně byla absorbance proměřena znovu v čase 5 min při stejné vlnové délce.
- Obrázek č. 17 ukazuje schematické zobrazení jamek destičky při tomto stanovení.

	Roztok testované látky C_1	Roztok testované látky C_2	Roztok testované látky C_x	Rozpouštědlo DMSO	Kontrolní jamky HA
Jamky s indikátorem					
Slepé vzorky					

	Testovací jamky (roztoky testované látky nebo DMSO)
	Kontrolní jamky (roztok HA)
	Jamky s indikátorem (roztok BCS)
	Slepé vzorky (ultračistá voda)

Konečný obsah jamek:
100 μl pufru
50 μl roztoku testované látky nebo DMSO nebo roztoku HA
50 μl roztoku Cu^{2+} iontů
50 μl roztoku BCS nebo ultračisté vody

Obrázek č. 17: Schematické zobrazení jamek mikrotitrační destičky při měření redukce měďnatých iontů

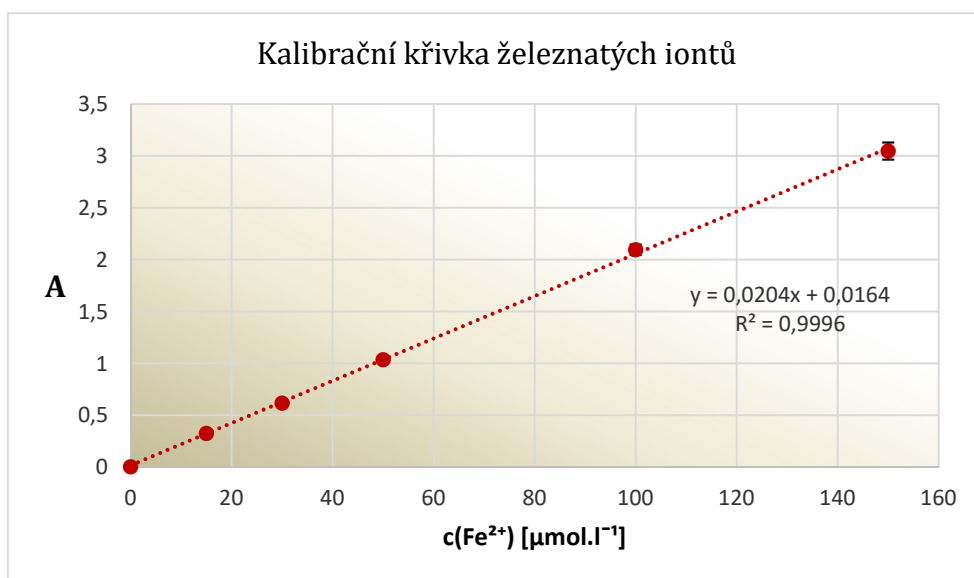
5 VÝSLEDKY

5.1 SESTROJENÍ KALIBRAČNÍ KŘIVKY ŽELEZNATÝCH IONTŮ

Dle metodického postupu pro sestrojení kalibrační křivky železnatých iontů byly naměřeny příslušné hodnoty absorbance pro jednotlivé roztoky železnatých iontů o koncentracích 75, 150, 250, 500 a 750 μM (Tabulka č. 1). Naměřené hodnoty absorbance byly pomocí programu Microsoft Excel převedeny do grafu kalibrační křivky (Obrázek č. 18) popisující závislost absorbance na koncentraci železnatých iontů. Jednalo se o lineární závislost.

Základní koncentrace Fe^{2+} iontů (μM)	0	75	150	250	500	750
Konečná koncentrace Fe^{2+} iontů (μM)	0	15	30	50	100	150
Průměrná hodnota absorbance	0,005	0,327	0,618667	1,037	2,097	3,048

Tabulka č. 1: Naměřené hodnoty pro sestrojení kalibrační křivky železnatých iontů



Obrázek č. 18: Kalibrační křivka železnatých iontů

5.2 INTERAKCE TESTOVANÝCH LÁTEK S IONTY ŽELEZA

Pro měření chelatační i redukční aktivity testovaných látek byl jako indikátor využíván ferrozín, který tvoří barevné komplexy s Fe^{2+} ionty.

U chelatačního měření bylo jako kontrola využito rozpouštědlo DMSO, které postrádá jakoukoli železo-chelatační aktivitu.

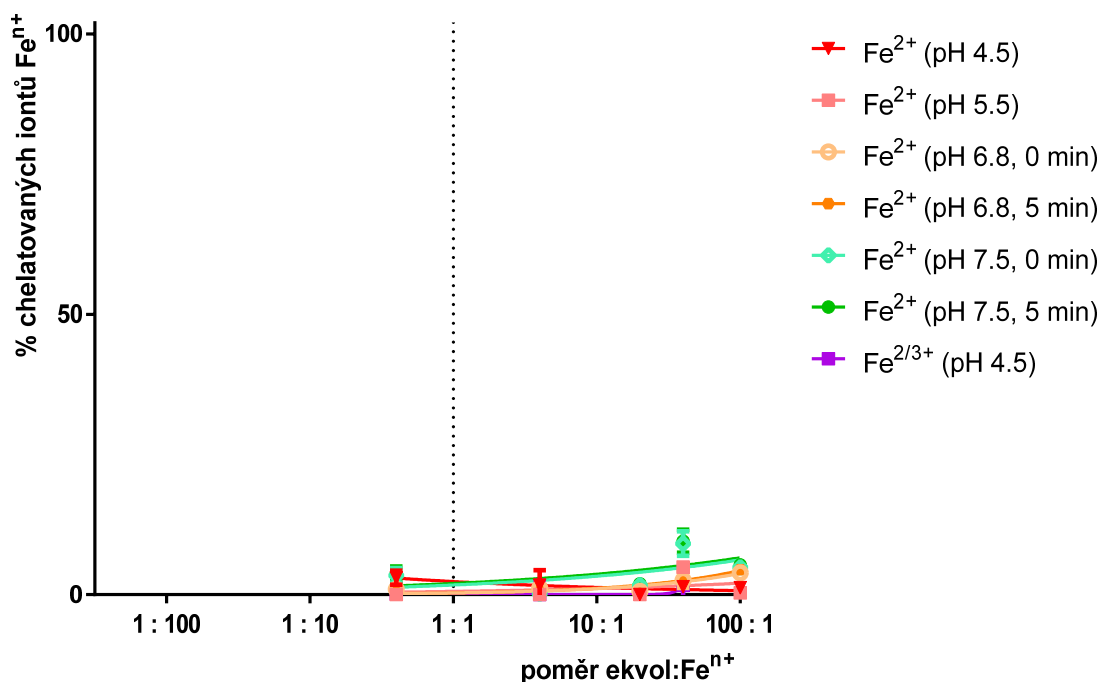
Jako pozitivní kontrola u redukčního měření byla využita schopnost roztoku HA redukovat všechny přítomné Fe^{3+} ionty na Fe^{2+} ionty.⁴⁵

5.2.1 Chelatační účinnost testovaných látek

Měření železo-chelatační aktivity metabolitů isoflavonoidů bylo provedeno *in vitro* pro různé koncentrace testovaných látek a při odlišných hodnotách pH.

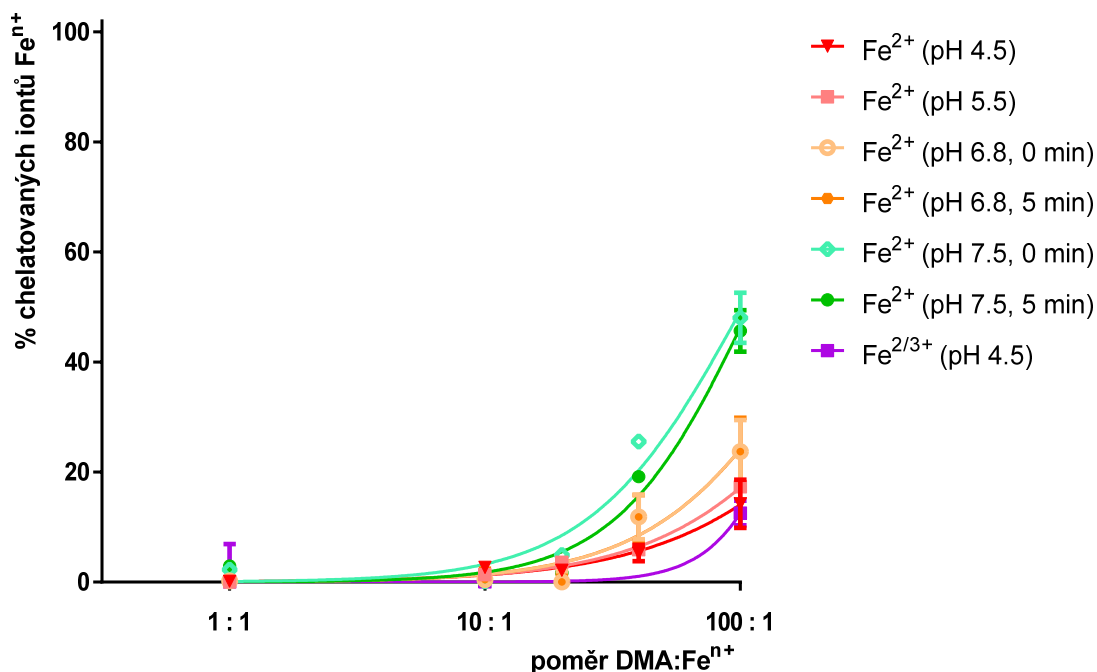
Naměřené hodnoty chelatační aktivity ekvolu (Obrázek č. 19) a DMA (Obrázek č. 20) byly zaneseny do grafů. Na ose X je vždy znázorněn poměr koncentrací testované látky ku roztokům iontů železa. Na ose Y je procentuálně vyjádřena schopnost testované látky chelatovat přítomné ionty železa. Barevně jsou odlišena měření při různých hodnotách pH a v různém čase.

5.2.1.1 Ekvol



Obrázek č. 19: Grafické zobrazení schopnosti ekvolu chelatovat ionty železa

5.2.1.2 Desmethylangolensin



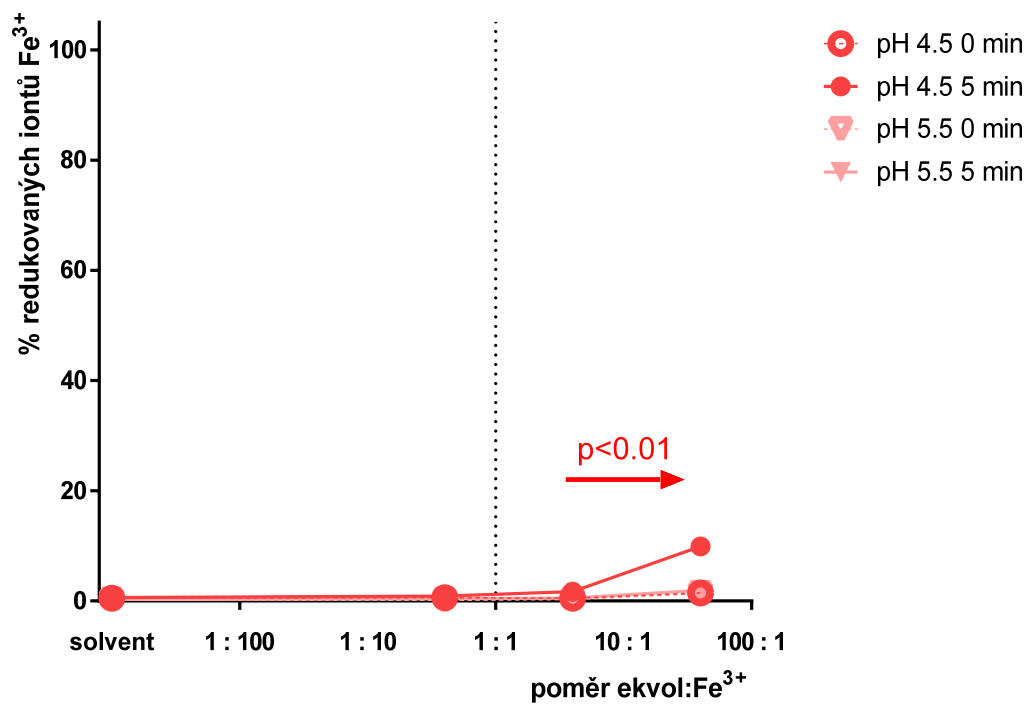
Obrázek č. 20: Grafické zobrazení schopnosti desmethylangolensinu chelatovat ionty železa

5.2.2 Redukční účinnost testovaných látek

Měření schopnosti metabolitů isoflavonoidů redukovat železité ionty bylo provedeno *in vitro* pro různé koncentrace testovaných látek a při odlišných hodnotách pH.

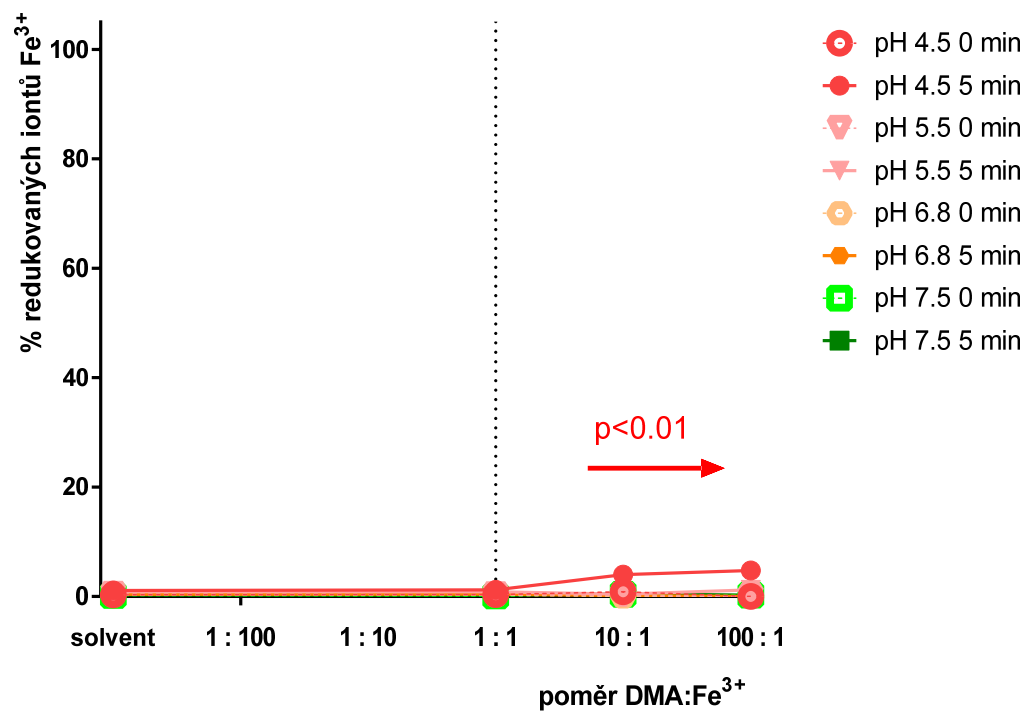
Naměřené hodnoty redukční aktivity ekvolu (Obrázek č. 21) a DMA (Obrázek č. 22) byly zaneseny do grafů. Na ose X je vždy vyobrazen poměr koncentrací testované látky ku roztoku železitých iontů. Na ose Y je procentuálně vyjádřena schopnost testované látky redukovat přítomné železité ionty. Barevně jsou odlišena měření při různých hodnotách pH a v čase 0 a 5 minut. Červenými šipkami jsou značeny statisticky odlišné hodnoty v porovnání s rozpouštědlem (DMSO).

5.2.2.1 Ekvol



Obrázek č. 21: Grafické zobrazení schopnosti ekvolu redukovat železitě ionty

5.2.2.2 Desmethylangolensin



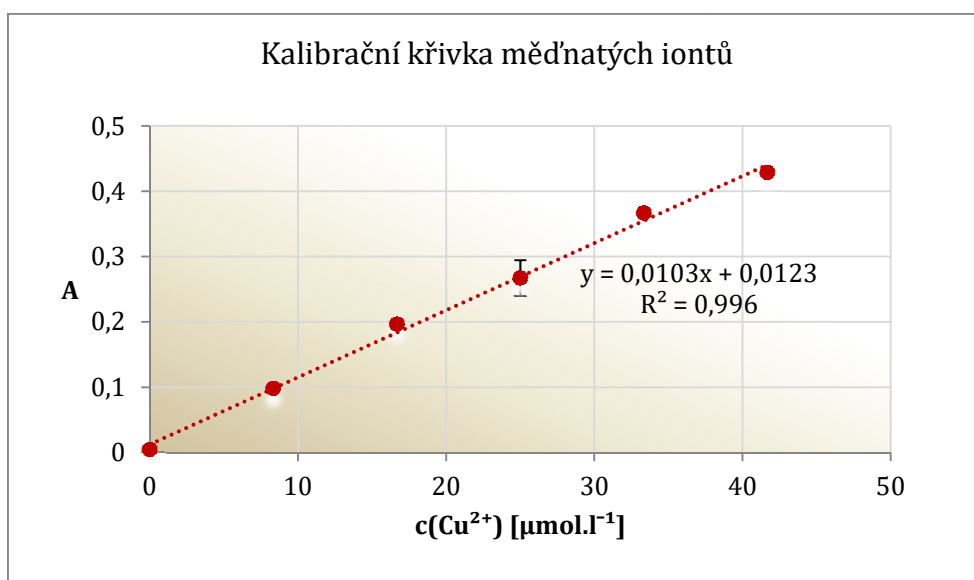
Obrázek č. 22: Grafické zobrazení schopnosti desmethylangolensinu redukovat železitě ionty

5.3 SESTROJENÍ KALIBRAČNÍ KŘIVKY MĚD'NATÝCH IONTŮ

Dle metodického postupu pro sestrojení kalibrační křivky měďnatých iontů byly naměřeny příslušné hodnoty absorbance pro jednotlivé roztoky měďnatých iontů o koncentracích 50, 100, 150, 200 a 250 μM (Tabulka č. 2). Naměřené hodnoty absorbance byly pomocí programu Microsoft Excel převedeny do grafu kalibrační křivky (Obrázek č. 23) popisující závislost absorbance na koncentraci železnatých iontů. Jednalo se o lineární závislost.

Základní koncentrace Cu^{2+} iontů (μM)	0	50	100	150	200	250
Konečná koncentrace Cu^{2+} iontů (μM)	0	8,33333	16,6667	25	33,3333	41,6667
Průměrná hodnota absorbance	0,004	0,0975	0,196	0,2665	0,366	0,428

Tabulka č. 2: Naměřené hodnoty pro sestrojení kalibrační křivky měďnatých iontů



Obrázek č. 23: Kalibrační křivka měďnatých iontů

5.4 INTERAKCE TESTOVANÝCH LÁTEK S IONTY MĚDI

Chelatační stanovení metodou hematoxylinu bývá používáno pouze k prvotnímu ověření měď-chelatační aktivity. HEM tvoří komplexy s Cu^{2+} ionty a tyto komplexy jsou poměrně málo stabilní. V kyselejších prostředích je tato metoda neúčinná.⁴⁶

V druhém typu chelatačního stanovení tvoří indikátor bathocuproin komplexy s Cu^+ ionty, které jsou stabilnější než komplexy s HEM i v širokém rozmezí pH.⁴⁶

Při chelataci měďných iontů je před přidáním samotných Cu^+ iontů napipetován roztok HA, který zde má za úkol udržet měď v redukovaném stavu.

Při chelataci měďnatých iontů je roztok HA pipetován až po přidání Cu^{2+} k redukci nezreagovaných Cu^{2+} iontů.

V obou případech je nechelatovaná měď prokázána roztokem BCS.⁴⁷

U obou metod (HEM i BCS) je jako kontrola využíváno rozpouštědlo DMSO.

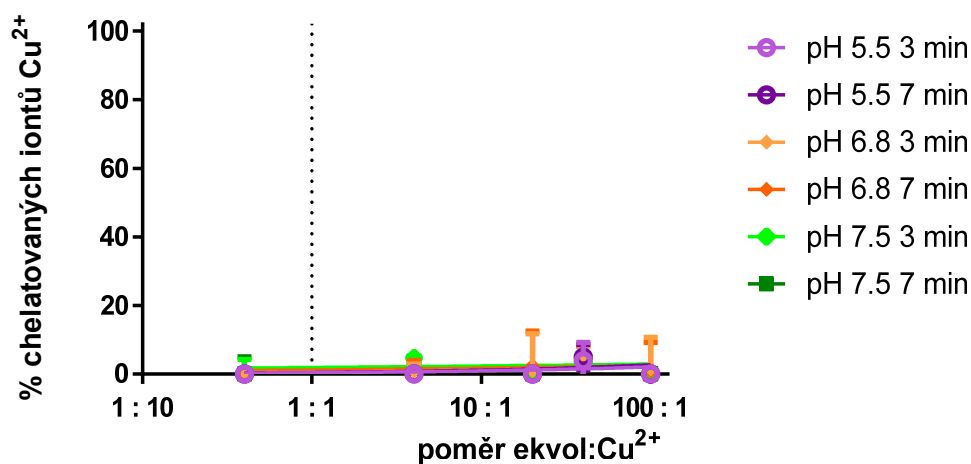
Jako pozitivní kontrola u redukčního měření byla využita schopnost roztoku HA redukovat všechny přítomné Cu^{2+} ionty na Cu^+ ionty.⁴⁶

5.4.1 Chelatační účinnost testovaných látek - metoda s hematoxylinem

Měření měď-chelatační aktivity metabolitů isoflavonoidů bylo provedeno *in vitro* pro různé koncentrace testovaných látek a při odlišných hodnotách pH.

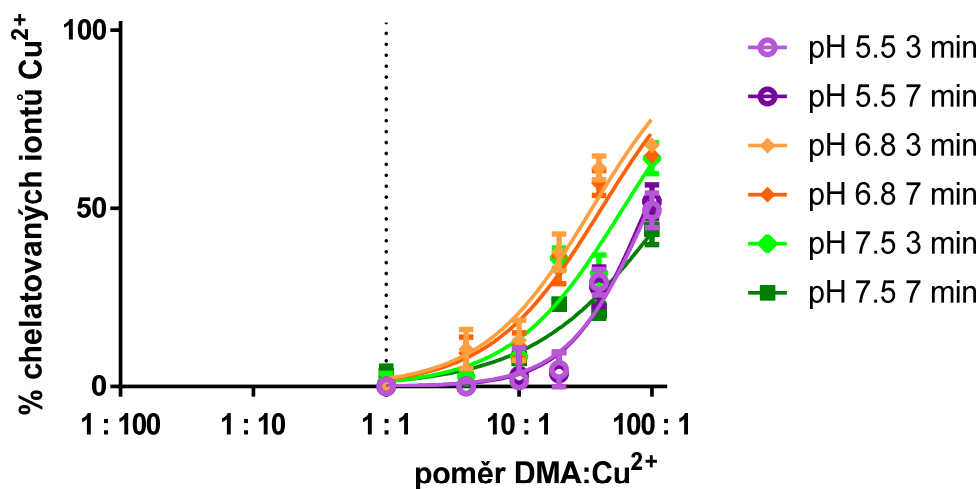
Naměřené hodnoty chelatační aktivity ekvolu (Obrázek č. 24) a DMA (Obrázek č. 25) byly zaneseny do grafů. Na ose X je vždy vyobrazen poměr koncentrací testované látky ku roztoku měďnatých iontů. Na ose Y je procentuálně vyjádřena schopnost testované látky chelatovat přítomné měďnaté ionty. Barevně jsou odlišena měření při různých hodnotách pH a v čase 3 a 7 min.

5.4.1.1 Ekvol



Obrázek č. 24: Grafické zobrazení schopnosti ekvolu chelatovat měďnaté ionty - metoda s HEM

5.4.1.2 Desmethylangolensin



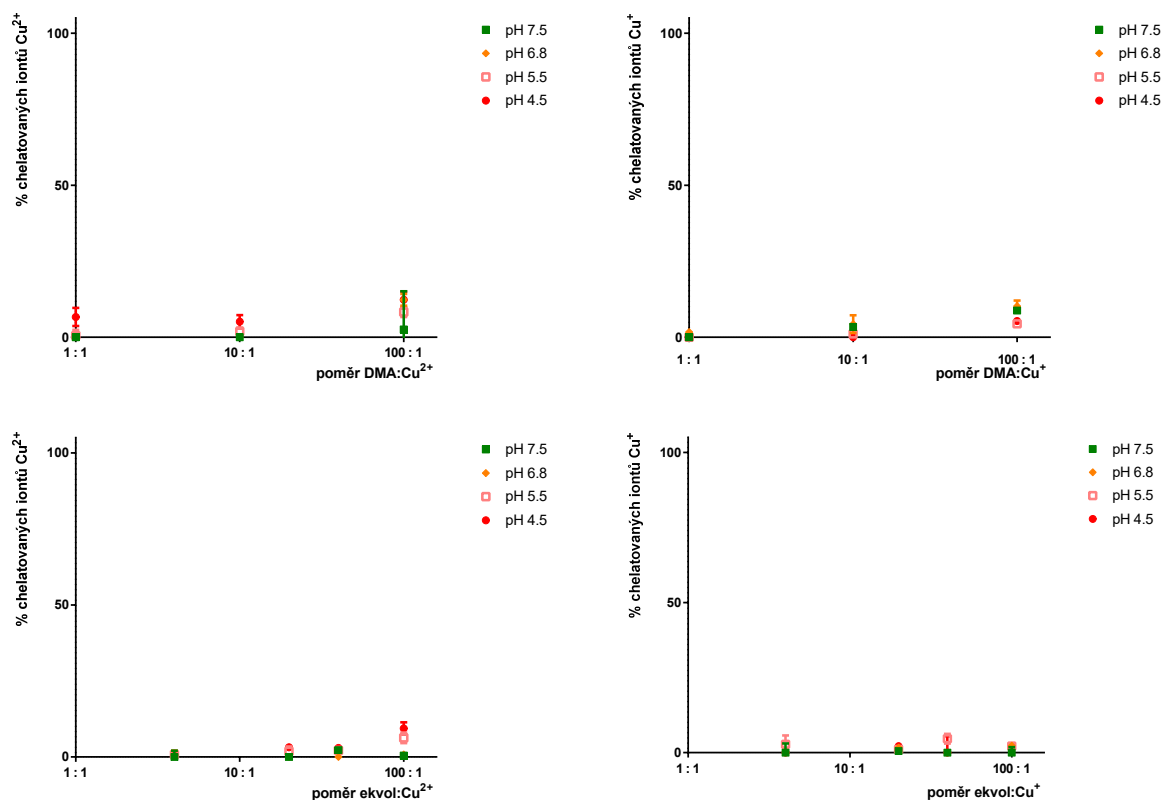
Obrázek č. 25: Grafické zobrazení schopnosti desmethylangolensinu chelatovat měďnaté ionty - metoda s HEM

5.4.2 Chelatační účinnost testovaných látek - metoda s bathocuproinem

Měření měď-chelatační aktivity metabolitů isoflavonoidů bylo provedeno *in vitro* pro různé koncentrace testovaných látek a při odlišných hodnotách pH.

Naměřené hodnoty chelatační aktivity ekvolu a DMA (Obrázek č. 26) byly zaneseny do grafů. Na ose X je vždy vyobrazen poměr koncentrací testované látky ku roztokům iontů mědi. Na ose Y je procentuálně vyjádřena schopnost testované látky chelatovat přítomné ionty mědi. Barevně jsou odlišena měření při různých hodnotách pH.

Žádná z testovaných látek nebyla schopna významně chelatovat ionty mědi ani při měření v čase 0 min (výsledky nezobrazeny) ani v čase 5 min.



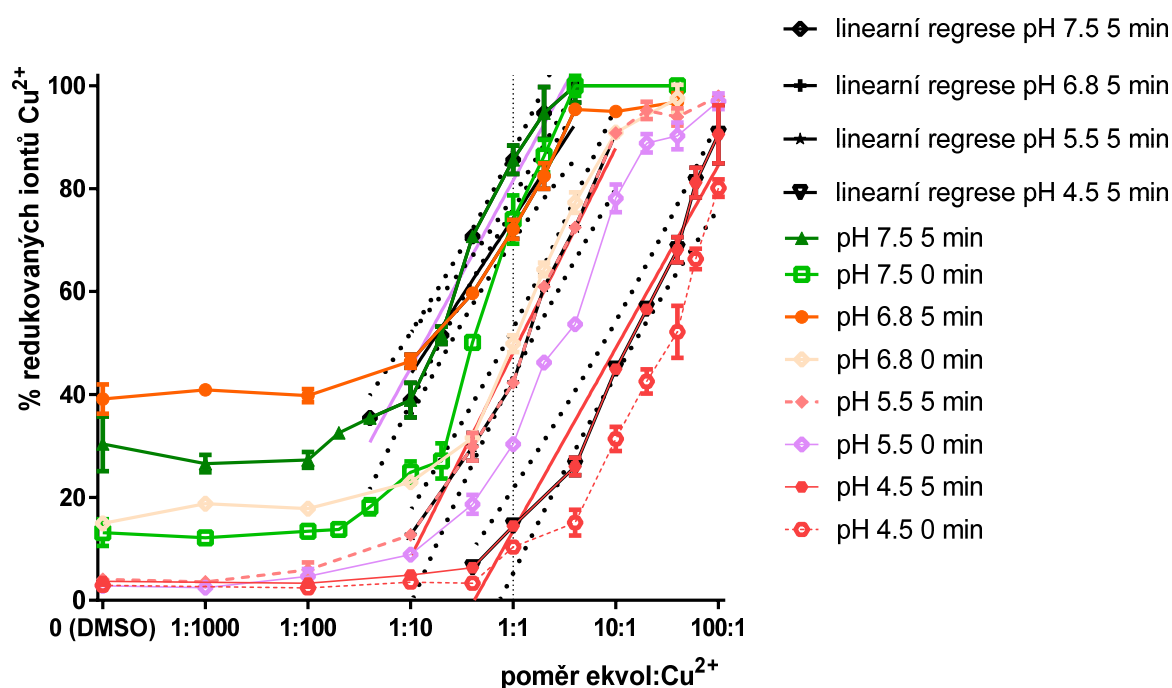
Obrázek č. 26: Grafické zobrazení schopnosti ekvolu a desmethyldangolensinu chelatovat ionty mědi v čase 5 min - metoda s BCS

5.4.3 Redukční účinnost testovaných látek

Měření schopnosti metabolitů isoflavonoidů redukovat měďnaté ionty bylo provedeno *in vitro* pro různé koncentrace testovaných látek a při odlišných hodnotách pH.

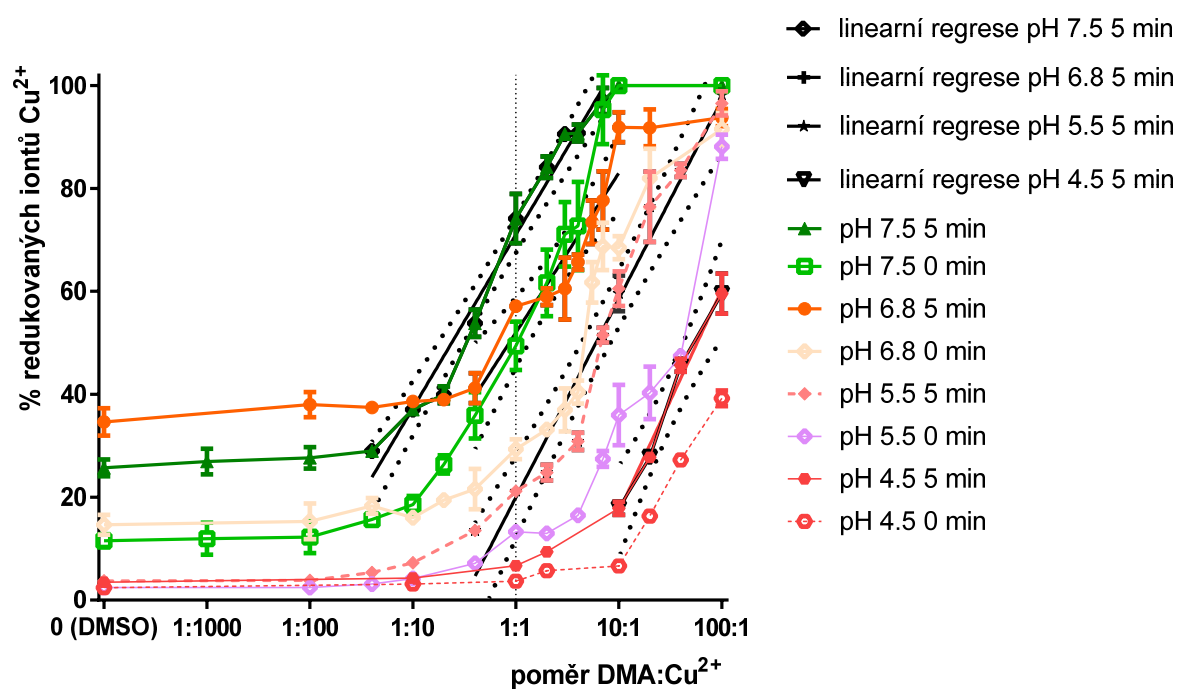
Naměřené hodnoty redukční aktivity ekvolu (Obrázek č. 27) a DMA (Obrázek č. 28) byly zaneseny do grafů. Na ose X je vždy znázorněn poměr koncentrací testované látky ku roztoku měďnatých iontů. Na ose Y je procentuálně vyjádřena schopnost testované látky redukovat přítomné ionty mědi. Barevně jsou odlišena měření při různých hodnotách pH a v čase 0 a 5 min.

5.4.3.1 Ekvol



Obrázek č. 27: Grafické zobrazení schopnosti ekvolu redukovat měďnaté ionty

5.4.3.2 Desmethylangolensin



Obrázek č. 28: Grafické zobrazení schopnosti desmethylangolensinu redukovat měďnaté ionty

6 DISKUZE A ZÁVĚR

Železo i měď patří mezi esenciální mikrobiogenní prvky potřebné pro správnou funkci celého organismu.¹ Železo řídí transport kyslíku do tkání, podílí se na buněčném dýchání, tvorbě energie, syntéze DNA atd.⁶ Mědi je v organismu obsaženo sice podstatně méně než železa, ale pro tělo je neméně důležitá. Je složkou řady enzymů, které jsou potřebné pro antioxidační působení, tvorbu energie, homeostázu železa, vývoj pojivové tkáně aj.^{1, 10}

Oba kovy mají tu zásadní vlastnost, že mohou existovat v různých redoxních stavech (jako oxidované a redukované ionty) a mezi těmito stavy volně přecházet. Tato vlastnost je využívána při reakcích, ve kterých jsou přenášeny elektrony. Právě oxidační stav iontů hraje důležitou roli ve správném fungování organismu.^{9, 10}

Výrazný a dlouhodobý nadbytek i nedostatek obou kovů může být pro organismus fatální. Nadbytek volných iontů železa i mědi totiž může potencovat vznik volných radikálů, které pak poškozují bílkoviny, lipidy i DNA.¹³ Nedostatek vede také k různým patologickým stavům. Pro přirozenou funkci organismu je tedy zásadní udržet správnou homeostázu obou prvků.

Isoflavonoidy tvoří velmi významnou skupinu látek, protože vykazují mnoho zajímavých účinků, mezi které patří v první řadě estrogenní aktivita a antioxidační působení. Nelze opomenout ani jejich antikancerogenní, antianginózní, antiaterosklerotické a antiagregační účinky.^{31, 32, 35, 36, 37} Za určitých podmínek mají ale i negativní prooxidační aktivitu.³⁸ K jejich antioxidačnímu působení přispívá schopnost chelatovat různé ionty kovů. Chelatace se také využívá při akutních intoxikacích a přetížení organismu daným kovem.⁴³ Naopak prooxidační aktivita je přisuzována jejich schopnosti redukovat různé ionty kovů, čímž je podpořen vznik volných radikálů nejčastěji Fentonovou reakcí.⁴⁴

Cílem této diplomové práce bylo otestovat chelatační a redukční aktivitu dvou metabolitů isoflavonoidů, ekvolu a desmethylangolensinu. Měření byla prováděna jednak pro ionty železa, ale i mědi.

V článku Karlíčková a kol. bylo testováno celkem třináct různých isoflavonů. Jedním z nich byl i daidzein, hlavní látka, ze které při metabolismu v tlustém střevě vznikají právě mnou testované látky. Při testování bylo zjištěno, že daidzein nemá schopnost chelatovat ionty železa ani mědi, protože ve své struktuře (Obrázek č. 7) neobsahuje žádné chelatační místo. Co se týče redukční aktivity, daidzein byl schopen redukovat pouze měďnaté ionty, nikoli železité. Z těchto informací bylo čerpáno před prováděným měřením chelatační a redukční aktivity ekvolu a desmethylangolensinu.³⁸

K porovnání interakcí testovaných látek s ionty železa byly využity pouze kompetitivní metody za použití ferrozinu jako indikátoru.

Při chelatačním stanovení vykazoval ekvol (Obrázek č. 19) pouze minimální železo-chelatační aktivitu (do 10 %) při všech použitých pH. Naopak desmethylangolensin byl schopen chelatovat ionty železa s mnohem vyšší intenzitou (Obrázek č. 20). Se stoupajícím pH a koncentrací DMA se zvyšovaly i jeho chelatační účinky. Dosáhly maxima 50 % chelatovaných iontů v prostředí pufru o pH 7,5 v nejvyšším koncentračním poměru 100:1 (poměr DMA a iontů železa).

Schopnost redukovat železité ionty postrádají obě testované látky (Obrázek č. 21 a 22). Ani jeden z metabolitů totiž neredukoval železité ionty z více než 10 %. Tohoto maxima dosáhly obě látky pouze při měření v prostředí pufru o pH 4,5 a to ve vyšších koncentračních poměrech.

K porovnání interakcí testovaných látek s ionty mědi byly použity dvě metody, jedna slabě kompetitivní za použití hematoxylinu jako indikátoru k prvotnímu ověření měď-chelatační aktivity a druhá kompetitivní (více průkazná) metoda za použití disodné soli bathocuproindisulfonové kyseliny jako indikátoru.

Při stanovení chelatační aktivity slabě kompetitivní metodou (s HEM) byla u desmethylangolensinu (Obrázek č. 25) naměřena schopnost chelatace měďnatých iontů u všech použitých pH (5,5, 6,8 i 7,5), která je zřetelná nejvíce v koncentračním poměru 100:1 (poměr DMA a měďnatých iontů). Nejvyšší chelatační schopnost látky byla u pH 6,8 a mírně dokonce přesáhla hodnotu 50 %. U ekvolu (Obrázek č. 24) nebyla zjištěna žádná chelatační aktivita. Nicméně za použití kompetitivní metody (s BCS) byly obě látky pouze slabě chelatačně aktivní (Obrázek č. 26). Množství chelatovaných iontů mědi nepřesáhlo hranici 10 %.

Schopnost redukovat měďnaté ionty byla pozorována u obou testovaných látek při všech použitých pH (4,5, 5,5, 6,8 a 7,5). Maxima 100 % redukovanych měďnatých iontů dosáhly ve vyšších koncentračních poměrech a v prostředí pufrů o vyšších pH. Redukční aktivita ekvolu (Obrázek č. 27) byla vyšší než desmethylangolensinu (Obrázek č. 28), což bylo zjištěno na základě provedené lineární regrese u všech použitých pH.

V porovnání s výsledkem studie v článku Karlíčková a kol., kde daidzein postrádal schopnost chelatace iontů železa i mědi, vykazovaly mnou testované metabolity mírnou chelatační aktivitu. Schopnost redukce měďnatých iontů byla obdobná.

Struktura těchto látek (Obrázek č. 7) nemá žádné chelatační místo. Neměly by tedy být schopny výrazně chelatovat ionty kovů, což potvrzují i mnou zjištěné výsledky, které vykazaly jen poměrně slabý chelatační potenciál u desmethylangolensinu (Obrázek č. 20, 25 a 26) a zcela minimální u ekvolu (Obrázek č. 19, 24 a 26). Tento účinek je odvozen od přítomnosti keto skupiny v blízkosti fenolické skupiny, kterou DMA ve své struktuře na rozdíl od ekvolu obsahuje.

Chelatační účinek obou metabolitů, který byl měřením prokázán, koresponduje s výsledky získanými v jiných studiích, např. v článku autorek Rüferové a Kullingové, ve kterém byla potvrzena antioxidační aktivita ekvolu i desmethylangolensinu.³⁹ Antioxidační účinek ekvolu souvisí pravděpodobně s jeho mírnou chelatační aktivitou, ale na druhé straně se může projevit i jeho prooxidační účinek, který souvisí s jeho výrazným redukčním potenciálem.⁴⁸

Redukční účinek metabolitů isoflavonoidů byl popsán pouze u měďnatých iontů. Článek Mira a kol. uvádí, že flavonoidy redukují jak ionty železa, tak ionty mědi, zatímco isoflavonoidy pouze ionty mědi, což bylo potvrzeno i mými výsledky.⁴⁴

Závěrem lze konstatovat, že mnou získané výsledky v tomto experimentu korespondují s výsledky získanými v jiných studiích. Mírné chelatační účinky ekvolu i desmethylangolensinu ukazují na jejich antioxidační aktivitu a naopak prokázané redukční účinky na možnou prooxidační aktivitu.

7 LITERATURA

1. Roedigerová-Streubelová S.: *Minerální látky a stopové prvky*. Praha: Ivo Železný, nakladatelství a vydavatelství, spol. s r. o., 1997. Praktické recepty, sv. 4. ISBN 80-237-3490-3.
2. Koval V.: *Kov života a smrti*. Praha: Mladá fronta, 1957.
3. Píšek F., Jeníček L., Ryš P.: *Nauka o materiálu I: Železo a jeho slitiny*. 2., rozšířené a zcela přepracované vydání. Praha: ACADEMIA, 1975. Nauka o kovech 4. svazek.
4. Janča, Jiří. *Co nám chybí: Kovy, jiné prvky a vitamíny v lidském těle*. Praha: Eminent, 1991. ISBN 80-900302-4-6.
5. Silbernagl S., LANG F.: *Atlas patofyziologie*. Překlad 2. anglického vydání. Praha: Grada Publishing, 2012. ISBN 978-80-247-3555-9.
6. Czerwinka M., Tokarz A.: Iron in red meat—friend or foe. *Meat Science* 123, 157-165 (2017).
7. Masopust J., Průša R.: *Patobiochemie metabolických drah*. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, 1999. ISBN 80-238-4589-6.
8. Zadák Z.: *Výživa v intenzivní péči*. 2., rozšířené a aktualizované vydání. Praha: Grada Publishing, 2008. ISBN 978-80-247-2844-5.
9. Mladěnka P., Hrdina R., Hübl M., Šimůnek T.: The fate of iron in the organism and its regulatory pathways. *ACTA MEDICA* 48, 127-135 (2005).
10. Collins J. F. (Eds): *Molecular, Genetic, and Nutritional Aspects of Major and Trace Minerals*. Academic Press, 2017. ISBN 978-0-12-802168-2.
11. Bechaux J., de La Pomélie D., Théron L., Santé-Lhoutellier V., Gatellier P.: Iron-catalysed chemistry in the gastrointestinal tract: Mechanisms, kinetics and consequences. *Food Chemistry* 268, 27–39 (2018).
12. Blanco-Rojo R., Pilar Vaquero M.: Iron bioavailability from food fortification to precision nutrition. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.04.015>.
13. Chifman J., Laubenbacher R., Torti S. V.: A Systems Biology Approach to Iron Metabolism. *Adv Exp Med Biol* 844, 201–225 (2014).
14. Percy L., Mansour D., Fraser I.: Iron deficiency and iron deficiency anaemia in women. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 40, 55-67 (2017).
15. Sobolevskij V. J., Bouška V.: *Klenoty přírody: drahé kovy, kameny a šperky*. Praha: Lidové nakladatelství, 1990. ISBN 80-7022-063-5.
16. Drastík F., Beneš A., Průcha J., Esterka B., Novák L.: *Atlas použití kovů ve strojírenství, elektrotechnice a v chemickém průmyslu*. Praha: SNTL/ALFA, 1980. ISBN 04-227-80.

17. Gaetke L. M., Chow C. K.: Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* 189, 147-163 (2003).
18. Mareček Z.: *Wilsonova choroba*. Praha: Galén, 1996. ISBN 80-85824-37-X.
19. Racek J. et al.: *Klinická biochemie*. 2., přepracované vydání. Praha: Galén, 2006. ISBN 80-7262-324-9.
20. Bertinato J., L'Abbé M. R.: Maintaining copper homeostasis: regulation of copper-trafficking proteins in response to copper deficiency or overload. *Journal of Nutritional Biochemistry* 15, 316-322 (2004).
21. Tapiero H., Townsend D. M., Tew K. D.: Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 57, 386-398 (2003).
22. López de Romaña D., Olivares M., Uauy R., Araya M.: Risks and benefits of copper in light of new insights of copper homeostasis. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 25, 3-13 (2001).
23. <http://www.galenus.cz/clanky/vyziva/mineraly-med>, staženo 28. 7. 2018.
24. Squitti R., Siotto M., Polimanti R.: Low-copper diet as a preventive strategy for Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 35, 40-50 (2014).
25. Siotto M., Squitti R.: Copper imbalance in Alzheimer's disease: Overview of the exchangeable copper component in plasma and the intriguing role albumin plays. *Coordination Chemistry Reviews* 371, 86-95 (2018).
26. Wijmenga C., Klomp L. W. J.: Molecular regulation of copper excretion in the liver. *Proceedings of the Nutrition Society* 63, 31-39 (2004).
27. Wiggelinkhuizen M., Tilanus M. E. C., Bollen C. W., Houwen R. H. J. : Clinical efficacy of chelator agents and zinc in the initial treatment of Wilson disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 29, 947-958 (2009).
28. Ferenci P.: Review article: diagnosis and current therapy of Wilson's disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 19, 157-165 (2004).
29. Růžička E., Jiráček R.: *Alzheimerova nemoc a jiné demence*. Tematická příloha lékařských časopisů. Praha: Česká lékařská společnost J. E. Purkyně, 2001.
30. Squitti R.: Copper dysfunction in Alzheimer's disease: From meta-analysis of biochemical studies to new insight into genetics. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 26, 93-96 (2012).
31. Spilková J. a kolektiv. *FARMAKOGNOZIE*. Praha: Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3264-3.
32. Applová L., Karlíčková J., Říha M., Filipský T., Macáková K., Spilková J., Mladěnka P.: The isoflavonoid tectorigenin has better antiplatelet potential than acetylsalicylic acid. *Phytomedicine* 35, 11-17 (2017).

33. Chandrasekharan S., Aglin A.: Pharmacokinetics of Dietary Isoflavones. *Journal of Steroids & Hormonal Science* 12 (2013).
34. Heinonen S. M., Hoikkala A., Wähälä K., Adlercreutz H.: Metabolism of the soy isoflavones daidzein, genistein and glycitein in human subjects. Identification of new metabolites having an intact isoflavonoid skeleton. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 87, 285-299 (2003).
35. Franke A. A., Lai J. F., Halm B. M.: Absorption, distribution, metabolism, and excretion of isoflavonoids after soy intake. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 559, 24-28 (2014).
36. Setchell K. D. R., Brown N. M., Lydeking-Olsen E.: The Clinical Importance of the Metabolite Equol-A Clue to the Effectiveness of Soy and Its Isoflavones. *Journal of Nutrition* 132, 3577-3584 (2002).
37. Sugihara N., Arakawa T., Ohnishi M., Furuno K.: Anti- and Pro-Oxidative Effects of Flavonoids on Metalinduced Lipid Hydroperoxide-Dependent Lipid Peroxidation in Cultured Hepatocytes Loaded with α -Linolenic Acid. *Free Radical Biology & Medicine* 27, 1313-1323 (1999).
38. Karlíčková J., Macáková K., Říha M., Pinheiro L. M. T., Filipský T., Horňasová V., Hrdina R., Mladěnka P.: Isoflavones Reduce Copper with Minimal Impact on Iron *In Vitro*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, ID 437381 (2015).
39. Rüffer C. E., Kulling S. E.: Antioxidant Activity of Isoflavones and Their Major Metabolites Using Different *In Vitro* Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 2926-2931 (2006).
40. Lephart E. D.: Skin aging and oxidative stress: Equol's anti-aging effects via biochemical and molecular mechanisms. *Ageing Research Reviews* 31, 36-54 (2016).
41. Frankenfeld C. L.: O-Desmethylangolensin: The Importance of Equol's Lesser Known Cousin to Human Health. *Advances in Nutrition* 2, 317-324 (2011).
42. Frankenfeld C. L., Atkinson Ch., Wähälä K., Lampe J. W.: Obesity prevalence in relation to gut microbial environments capable of producing equol or O-desmethylangolensin from the isoflavone daidzein. *European Journal of Clinical Nutrition* 68, 526-530 (2014).
43. Aaseth J., Skaug M. A., Cao Y., Andersen O.: Chelation in metal intoxication - Principles and paradigms. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 31, 260-266 (2015).
44. Mira L., Fernandez M. T., Santos M., Rocha R., Florêncio M. H., Jennings K. R.: Interactions of Flavonoids with Iron and Copper Ions: A Mechanism for their Antioxidant Activity. *Free Radical Research* 36, 1199-1208 (2002).

45. Macáková K., Mladěnka P., Filipský T., Říha M., Jahodář L., Trejtnar F., Bovicelli P., Proietti Silvestri I., Hrdina R., Saso L.: Iron reduction potentiates hydroxyl radical formation only in flavonols. *Food Chemistry* 135, 2584–2592 (2012).
46. Říha M., Karlíčková J., Filipský T., Macáková K., Hrdina R., Mladěnka P.: Novel method for rapid copper chelation assessment confirmed lowaffinity of D-penicillamine for copper in comparison with trientine and 8-hydroxyquinolines. *Journal of Inorganic Biochemistry* 123, 80–87 (2013).
47. Říha M., Karlíčková J., Filipský T., Macáková K., Rocha L., Bovicelli P., Proietti Silvestri I., Saso L., Jahodář L., Hrdina R., Mladěnka P.: *In vitro* evaluation of copper-chelating properties of flavonoids. *RSC Advances* 4, 32628–32638 (2014).
48. Choi E. J.: Evaluation of Equol Function on Anti- or Prooxidant Status *in vivo*. *Journal of Food Science* 74, 65–71 (2009).

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky

Kandidát: Hana Němcová

Konzultant: PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.

Název diplomové práce: Porovnání interakcí ekvolu a desmethylangolensinu se železem a mědí

Železo a měď jsou esenciální stopové prvky, které jsou důležité pro náš organismus. Oba prvky mají významný vliv na správnou funkci orgánů a jsou součástí mnoha enzymů. Jsou schopny přijímat nebo odevzdávat elektrony - přeměna mezi oxidovanou (Fe^{3+} , Cu^{2+}) a redukovanou (Fe^{2+} , Cu^{+}) formou. Při nadbytku se hromadí v buňkách a zprostředkovávají tvorbu volných radikálů, které ničí buněčné struktury. Tento nadbytek kovů se léčí pomocí chelátorů, které usnadňují jejich vyloučení z organismu.

Isoflavonoidy jsou polyfenolické látky, které mohou mít antioxidační účinek a podílet se na vychytávání volných radikálů. Zároveň mohou mít i negativní prooxidační efekt, protože jsou schopny redukovat ionty kovů.

V této studii byly testovány interakce (chelatace a redukce) mezi metabolity isoflavonoidů (ekvol a desmethylangolensin) a ionty železa a mědi. Obě látky jen slabě chelatovaly ionty kovů, ale jsou schopné výrazně redukovat měďnaté ionty.

KLÍČOVÁ SLOVA: Železo, Měď, Metabolity isoflavonoidů, Chelatace, Redukce

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany

Candidate: Hana Němcová

Supervisor: PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.

Title of Thesis: Comparison of interactions of equol and desmethylangolensin with iron and copper

Iron and copper are essential trace elements, which are important for our body. Both elements have a significant effect on the correct function of organs and make part of many enzymes. They are able to accept or donate electrons - conversion between oxidized (Fe^{3+} , Cu^{2+}) and reduced (Fe^{2+} , Cu^{+}) forms. If these metals are excess in organism, they are accumulated in the cells and mediate the creation of free radicals, that destroy cell structures. This deficiency is treated with chelators, which facilitate the excretion of metals from the body.

Isoflavonoids are polyphenolic substances, which can have antioxidant effects and they are involved in the scavenging of free radicals. Isoflavonoids can have also a pro-oxidative effect, because they are able to reduce metal ions.

In this study were tested interactions (chelation and reduction) between the metabolites of isoflavonoids (equol and desmethylangolensin) and ions of iron and copper. Both metabolites only weakly chelate metal ions, but they significantly reduce cupric ions.

KEYWORDS: Iron, Copper, Metabolites of isoflavonoids, Chelation, Reduction